

Université de Montréal

**Production et effet catabolique du 4-hydroxynonéanal dans les tissus  
articulaires arthrosiques : Un nouveau facteur impliqué dans la  
dégradation du cartilage**

Par

**Junie Barbara Morquette**

Programme de Sciences Biomédicales  
Faculté de médecine.

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès science (M. Sc.)  
en Sciences Biomédicales.

Septembre 2005

Copyright, Barbara J. Morquette, 2005.





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Production et effet catabolique du 4-hydroxynonénal dans les tissus  
articulaires arthrosiques : Un nouveau facteur impliqué dans la  
dégradation du cartilage**

présenté par :

**Junie Barbara Morquette.**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

- Daniel Lajeunesse  
Président –rapporteur
- Mohamed Benderdour  
Directeur de recherche
- Julio C. Fernandes  
Co-directeur
- Muhammad Zafarullah  
Membre du Jury.

## RÉSUMÉ FRANÇAIS

L'arthrose (OA) est la maladie musculo-squelettique la plus répandue au Canada. Un individu sur 10 en est atteint (Santé Canada 2003). Elle résulte de la détérioration chronique du cartilage articulaire accompagnée d'un processus inflammatoire et d'un stress oxydatif bien présent. La recherche de ces dernières années dans le domaine de l'OA a permis de comprendre beaucoup sur son évolution. Toutefois, ni l'étiologie ni un traitement efficace n'ont encore été trouvés pour cette pathologie.

D'un point de vue biochimique, l'OA se caractérise par le changement du métabolisme des chondrocytes, la dégradation du collagène type II (COLL II) via particulièrement l'augmentation des métalloprotéinase-13 (MMP-13) et par la dégradation des protéoglycanes. Cette détérioration est entretenue par une augmentation des radicaux libres (RL) et une diminution des anti-oxydants. Le 4-hydroxynonéal (HNE) résulte de l'attaque des RL au niveau des acides gras polyinsaturés de la membrane. Il est connu pour être l'aldéhyde le plus réactif et le plus cytotoxique. Présentement, bien qu'il ait été démontré que le niveau du HNE est augmenté dans la membrane synoviale des patients atteints d'OA comparé à celui des sujets normaux, son rôle n'a jamais été bien défini. Notre hypothèse est que le HNE jouerait un rôle comme facteur favorisant le catabolisme du cartilage OA. En conséquence, notre objectif vise à investiguer l'implication du HNE dans la dégradation du cartilage OA via la modulation du COLL II et de la MMP-13.

Nos résultats démontent que la concentration des complexes HNE/protéine augmente de façon significatif (i) dans le liquide synovial de

patients atteints d'OA comparativement aux sujets normaux et (ii) dans les extraits cellulaires de chondrocytes OA traités avec des donneurs de radicaux libres (RL). Au niveau post-traductionnel, le HNE induit la dégradation du cartilage dans des explants de cartilage, via la libération d'hydroxyproline et la formation de néoépitopes de COLL II. De plus, le niveau des complexes HNE/COLL II dans le cartilage OA est augmenté en présence des donneurs de RL. *In vitro*, nos résultats montrent que les complexes HNE/COLL II sont plus susceptibles à la dégradation par la MMP-13 active. En outre, la liaison du HNE à la MMP-13 active cette enzyme à un ratio molaire d'environ 100 :1 (HNE vs MMP-13). Au niveau transcriptionnel, le HNE inhibe la synthèse du COLL II et du TIMP-1, mais induit celle de la MMP-13 via l'activation de la p38 MAPK. Ainsi, les résultats de cette étude supportent, pour la première fois, l'hypothèse que le HNE joue un rôle important dans la pathophysiologie de l'OA.

**Mots clés :**

Cartilage, Chondrocytes, Collagène type II, 4-hydroxynonénal, Matrice extracellulaire, Métalloprotéinase-13, Peroxydation lipidique, Stress oxydatif.

## SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent musculoskeletal diseases in Canada. Nearly 1 person over 10 suffers from it. This pathology is characterized by chronic degradation of the cartilage, by inflammatory process and by the implication of oxidative stress. Even though researchers, in the few past year, have enlarged the comprehension of the progression of this pathology, nor the etiology or definitive treatment had been found. In a biochemical context, the deterioration of the cartilage is associated with chondrocytes metabolic change, type II collagen (COLL II) and proteoglycans degradation, and up-regulation of matrix metalloproteinases, particularly MMP-13. In addition, there is an extensive experimental evidence from *in vitro* and animal experiments indicating that OA disease is a state of increased oxidative stress associated by an enhance in reactive oxygen species (ROS) level and a decrease in anti-oxidants. 4-hydroxynonenal (HNE) is the principal  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehyde formed from ROS-induced LPO of polyunsaturated fatty acids cellular membrane. In the present study, we tested the hypothesis that HNE plays a key role in articular cartilage catabolism in OA progression. This work aimed to investigate the implication of HNE in OA cartilage degradation though COLL II and MMP-13 modulation. Our data showed that HNE/protein adducts were higher in OA synovial fluids compared to normal subjects and in treated OA chondrocytes with FR donors ( $H_2O_2$  and SIN) compared to untreated cells. In cartilage explants, HNE induces cartilage degradation as established by hydroxyprolyne release and COLL II fragments generation. We showed that HNE binding accelerates

COLL II degradation by active MMP-13. Interestingly, the level of HNE/COLL II adducts was increased in OA cartilage explants incubated with FR donors. In isolated OA chondrocytes, we demonstrated that HNE inhibits COLL II and TIMP-1 expression but in contrast induces MMP-13 activity and expression mainly through activation of p38 MAPK signaling pathway. *In vitro*, MMP-13 was identified as HNE target and was activated by this aldehyde at a molar ratio of 1:10<sup>2</sup> (MMP-13 vs HNE). In conclusion, we report here novel mechanisms linking oxidative stress to OA cartilage degradation. These mechanisms emphasize the implication of HNE in transcriptional and post-translational modifications of COLL II and MMP-13 in OA.

***Key words***

Cartilage, Chondrocytes, Extracellular matrix, 4-hydroxynonenal, Lipid peroxidation, Matrix metalloprotease-13, Oxidative stress, type II collagen.



## TABLE DES MATIÈRES

Résumé français .....	iii
Summary .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste de Tableaux.....	xi
Listes des abréviations .....	xii
Remerciements .....	xv
Dédicace.....	xvi
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
1 LE CARTILAGE ARTICULAIRE SAIN .....	2
1.1 Structure.....	2
1.2 Composition.....	2
1.2.1 Les cellules.....	4
1.2.2 La MEC et son organisation .....	5
1.2.3 L'eau .....	6
1.3 Caractéristiques biochimiques.....	6
1.3.1 COLL II .....	6
1.3.2 PGs.....	8
1.4 Caractéristiques métaboliques.....	11
2 PATHOPHYSIOLOGIE DE L'ARTHROSE OA.....	12
2.1 Mécanisme de dégradation du cartilage.....	12
2.1.1 MMPs et Aggrécánases.....	14
2.1.1.1 Les MMPs : mécanisme de régulation.....	16
2.1.1.1.1 Voies de signalisation impliquées dans la régulation des MMPs.....	17
2.1.1.1.2 Régulations transcriptionnelles des MMPs.....	18
2.1.1.1.3 Stimulation et inhibition de l'expression de la MMP- 13.....	21
2.1.1.1.4 Régulations post-traductionnelles des MMPs.....	22

2.1.2 Mécanisme de dégradation du collagène par les MMPs.....	27
2.1.3 Les cytokines et le stress oxydatif dans l'OA .....	27
<b>3 LE HNE : 4-HYDROXYNONENAL.....</b>	<b>31</b>
3.1 Formation et caractéristiques du HNE.....	31
3.2 Modes d'action du HNE .....	33
3.2.1 HNE et modifications post-traductionnelles des protéines .....	33
3.2.2 HNE et voies de signalisation .....	35
<b>4 OBJECTIF GÉNÉRAL .....</b>	<b>39</b>
<b>5 HYPOTHÈSES .....</b>	<b>40</b>
<b>CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>41</b>
1. Sélection des spécimens ...	42
2. Conditions de culture .....	42
3. Concentration tissulaire et cellulaire des complexes HNE/protéine....	43
4. Détermination des fragments du COLL II .....	44
5. Immunoprécipitation .....	45
6. Susceptibilité des complexes HNE/COLL II à la dégradation.....	46
7. Détection de protéines par Western Blotting .....	46
8. RT-PCR (Transcription inverse et polymérase en chaîne) .....	48
9. Détermination de la MMP-13 et du TIMP-1 .....	50
10. Inhibition des protéines kinases.....	50
11. Détermination de l'activité de la MMP-13 .....	50
12. Activation de la MMP-13 <i>in vitro</i> par le HNE.....	51
13. Analyses statistiques .....	51
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS.....</b>	<b>52</b>
Résumé de l'article .....	53
Article.....	55
Abstract.....	56

Introduction.....	57
Materials and methods.....	59
Results.....	65
Discussion.....	70
Legends.....	77
References List .....	86

<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>92</b>
---	-----------

<b>CHAPITRE V : CONCLUSION .....</b>	<b>102</b>
--------------------------------------	------------

<b>CHAPITRE VI : RÉFÉRENCES .....</b>	<b>105</b>
---------------------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES.

### CHAPITRE I : INTRODUCTION

Figure 1 : Schéma de la structure générale du cartilage articulaire chez l'adulte.....	3
Figure 2. a) schéma et b) photo électronique à balayage d'une molécule de COLL II .....	7
Figure 3 : Schéma d'un monomère de protéoglycane .....	9
Figure 4 : Schéma d'un réseau de macrofilament de collagènes de d'aggrécans associés avec l'acide hyaluronique (HA)....	10
Figure 5 : Déséquilibre de la balance anabolique / catabolique lors de l'OA : remodelage du cartilage .....	13
Figure 6: Promoteurs des MMPs humaines .....	19
Figure 7 : Schéma de la structure et du mécanisme d'activation des MMPs par l'APMA.....	23
Figure 8 : Cascade d'activation des MMPs.....	25
Figure 9 : Mécanisme de formation des néoépitopes de COLL II via l'action des collagénases.....	28
Figure 10 : Structure de la molécule du HNE .....	32
Figure 11 : Les intermédiaires du métabolisme du HNE .....	34
Figure 12 : Modes d'action du HNE .....	36

### CHAPITRE IV: DISCUSSION GÉNÉRALE

Figure 13: Mécanisme proposé de l'activation de la MMP-13 par le HNE .....	101
--	-----

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1: Activation des MMPs par les MMPs.....	26
--	----

## LISTES DES ABRÉVIATIONS

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADAMT : A Disintegrin And Metalloproteinase domain with Thrombospondin motifs

ADN: Acide désoxyribonucléique

AGRE: Élément riche en AG

AP-1: Activator protein-1

APMA : 4-aminophenylmercuric acetate

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATF-2: Activating transcription factor-2

COLL II : Collagène type II

Cox-2 : Cyclooxygénase-2

CYS : Cystéine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA : Disodium ethylenediaminetetra-actetate dihydrate

ELISA : Enzyme linked immunosorbante assay

ERK: Extracellular signal-related kinase

FBS: Fetal bovine serum

FR : Free radical

Gln : Glutamine

Gly : Glycine

GST : Glutathione S-transférase

HA: Acide hyaluranique

HIS : Histidine

HNE : 4-hydroxynonénal

HYP: Hydroxyproline

IKK : ikB kinase

IL-17: Interleukine-17

IL-1 $\beta$  : Interleukine-1 $\beta$

iNOS : Inducible nitric oxide synthase

Iso : Isoleucine

JNK: c-jun N-terminal kinase

Leu : Leucine

LPO : Peroxydation lipidique

LYS : Lysine

MAP : Mitogen activated protein

MAPK : MAP kinase

MAPKK : MAP kinase kinase

MAPKKK : MAP kinase kinase kinase

MEK : MAPK kinase of extracellular signal regulated kinase

MEC : Matrice extracellulaire

MDA : Malondialdéhyde

MMP : Matrix metalloproteinase

MMP-13 : Matrix metalloproteinase-13

MPT : Modification post-traductionnelle

MT-MMP : MMP de type membranaire

NF-kB: Facteur nucléaire de type kappa B

NO: Oxyde d'azote

OA : Arthrose

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR : Réaction de polymérase en chaîne

PEA-3: Polyoma enhancer A binding protein-3

PGs: Protéoglycanes

RA: Arthrite rhumatoïde

RIPA : Radioimmunoprecipitation assay

RL : Radicaux libres

ROS : Reactive oxygen species.

RT-PCR : Transcription inverse et polymérase en chaîne.

TIMP : Inhibiteur tissulaire des MMPs

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

SAPK: Stress-activated protein kinase

SDS: Dodecyl sulphate de sodium

SDS-PAGE: SDS-electrophorèse sur gel de polyacrylamide

SIN: 3-morpholinosydnonimine



## REMERCIEMENTS

Ma gratitude va spécialement à mon directeur de recherche, Mohamed Benderdour, dont la disponibilité et la patience ont été remarquables tout au long de ma maîtrise. Il a su me transmettre sa passion pour la recherche et m'encourager dans les moments difficiles.

Je veux remercier de même mon co-directeur de recherche, le docteur Julio C. Fernandes pour ses encouragements, son support et l'opportunité qu'il m'a donné de faire ma maîtrise dans ce laboratoire de recherche.

Je tiens à remercier aussi Qin Shi pour son aide lors de mes nombreuses manipulations et pour ces conseils pratiques.

Je ne saurais oublier mes parents qui m'ont soutenus et n'ont cessé de m'encourager à toujours aller de l'avant et à donner le meilleur de moi. Un grand merci aussi à Valérie, Martha, Farah, Guy-Joseph et tout ceux qui d'une manière ou d'une autre m'ont aidé à la correction et à la mise en page de ce mémoire.

Finalement, je remercie par dessus tout Dieu qui pourvoit à mes besoins et me donne sans cesse au delà de mes espérances.

À mes parents ...

**CHAPITRE I : INTRODUCTION**

**&**

**RECENSION DE LA LITTÉRATURE**

## **1. LE CARTILAGE ARTICULAIRE SAIN**

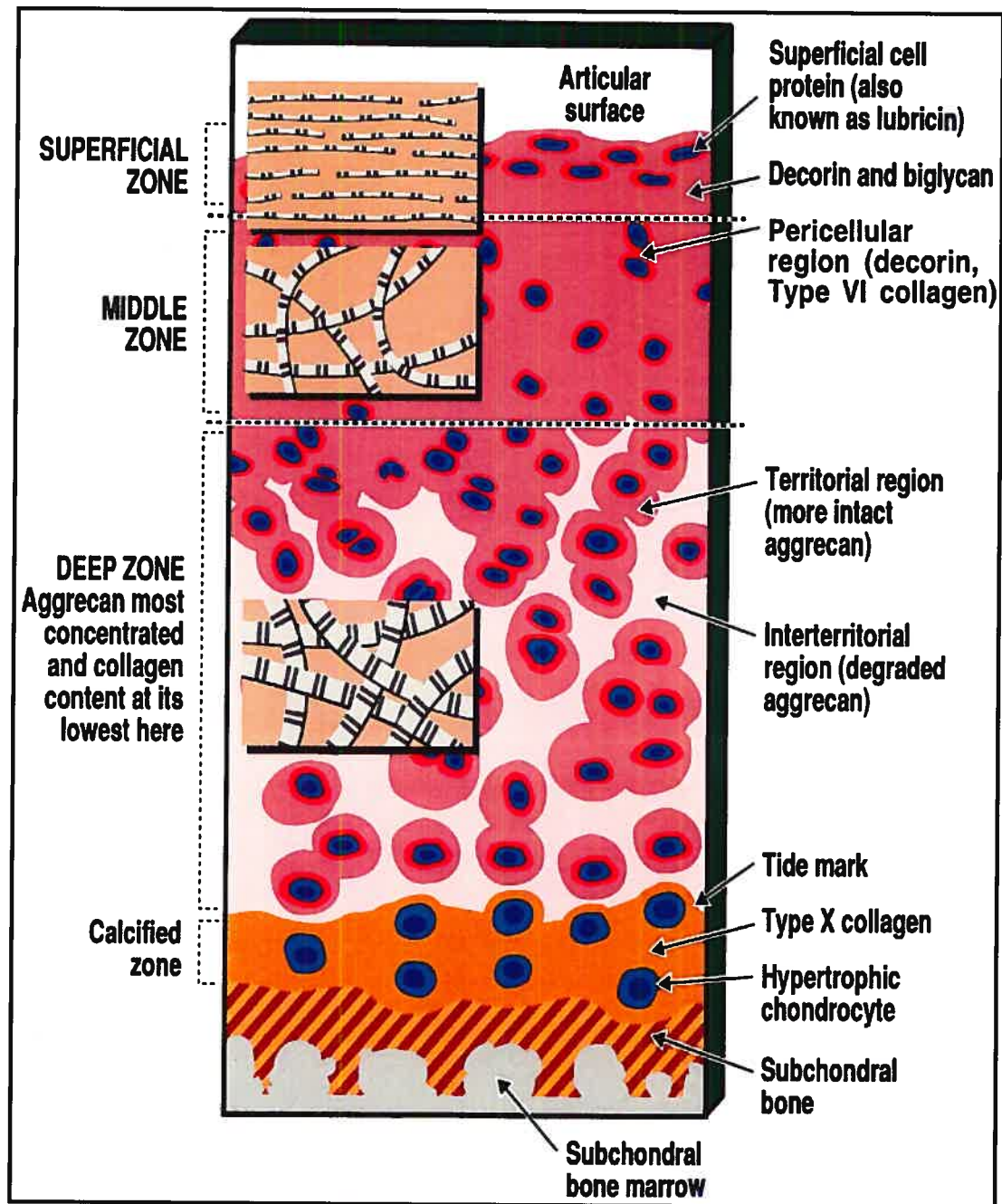
Les articulations synoviales jouent un rôle essentiel en facilitant le glissement des os sans difficulté et sans douleur lors des mouvements. Dans ces articulations synoviales, les os sont couverts par un cartilage hyalin (Marieb et al. 2005). Ce dernier est un tissu conjonctif important qui joue le rôle de coussin élastique avec une capacité d'amortissement extraordinaire des forces de compression exercées sur l'articulation par les os (Reginster et al. 1999). Dans cette première partie, nous nous attarderons sur les caractéristiques du cartilage articulaire humain sain de l'adulte, à savoir sa structure, sa composition et ses caractéristiques biochimiques.

### **1.1 Structure**

Le cartilage hyalin se divise en plusieurs couches appelées aussi zones qui sont de l'extérieur vers l'intérieur: 1) la zone tangentielle (couche superficielle), 2) La zone transitionnelle (couche moyenne), 3) la zone radiale (couche profonde) et 4) la zone calcifiée (figure 1). La transition entre les différentes couches se fait graduellement ; Toutefois, la couche profonde est séparée de la partie calcifiée par ce qu'on appelle le Tidemark. L'épaisseur des différentes couches est directement proportionnel à l'intensité de la force appliquée et diffère d'une articulation à l'autre (Reginster et al. 1999).

### **1.2 Composition**

Le cartilage articulaire est un tissu caractérisé par la présence d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, enfoui dans une matrice extracellulaire



Poole et al. 2001

**Figure 1:** Schéma de la structure générale du cartilage articulaire chez l'adulte.

contenant 65 à 75 % d'eau. Nous verrons de manière détaillée ces différents constituants :

### **1.2.1 Les cellules.**

Les chondrocytes sont le seul type cellulaire retrouvé dans le cartilage hyalin. Leur densité et leur forme varient en fonction de leur profondeur dans le cartilage. Ils sont plus denses dans la couche superficielle et diminuent graduellement pour atteindre une densité plus faible dans la couche calcifiée (figure 1): Dans la couche superficielle (zone tangentielle), située sous une mince couche de matrice, les chondrocytes sont en forme de disque et s'organisent en une couche épaisse de cellules. La couche moyenne (zone transitionnelle) contient des cellules de forme sphérique rassemblées en petits groupes dispersés aléatoirement dans le cartilage. La zone profonde (zone radiale) est caractérisée par la présence des chondrocytes de forme ovale qui s'assemblent en groupe de 2 à 6 cellules pour former des colonnes dont l'axe est perpendiculaire à la surface cartilagineuse. Dans la zone calcifiée, les chondrocytes sont en petit nombre, dispersés mais entourés par une substance non calcifiée (Poole et al. 2001).

Dans le cartilage hyalin, les chondrocytes sont très actifs et sont capables de sécréter une panoplie de molécules: des cytokines, des enzymes ainsi que leurs inhibiteurs, des facteurs de croissance et des constituants de la MEC. Ils vivent dans un environnement anaérobie, de

façon individuelle ou en petits groupes dans des lacunes de la MEC. (Reginster et al. 1999).

### 1.2.2 La MEC et son organisation.

La MEC est un enchevêtrement de protéines assemblées en un amas qui peut résister aux forces de compressions. Elle est constituée de deux composantes majeures, le collagène type II (COLL II) et les agrégats de protéoglycanes (PGs). Cette matrice est hydratée, synthétisée, assemblée et régulée par les chondrocytes (Marieb et al. 2005). N'étant ni vascularisée, ni innervée, l'apport des nutriments et la vidange des chondrocytes se fait via la MEC par diffusion (Reginster et al. 1999). L'épaisseur de chaque compartiment peut varier d'une région à l'autre dans le même cartilage ou d'un cartilage à l'autre.

La MEC peut être aussi divisée en plusieurs compartiments avec chacune une morphologie et des caractéristiques biochimiques distinctes (figure 1). La **zone péri-cellulaire** est caractérisée par l'absence de COLL II dans son organisation et une quantité importante d'agrégat de PG. La partie adjacente au périchondre, la **zone territoriale** (ou capsule de la matrice), est composée principalement d'un réseau de collagènes qui isole les cellules individuelles ou des groupes de chondrocytes (chondron) et apporte un support mécanique spécial à la cellule. La plus grande partie de la MEC est la **matrice interstitielle** dont la teneur en fibres de collagène et de PG est la plus grande (Poole et al. 2001).

Des changements au niveau de la capacité des chondrocytes à maintenir le réseau de collagène peuvent influencer la résistance du cartilage à la dégradation.

### **1.2.3 L'eau**

La composante majeure du cartilage articulaire humain normal est l'eau. Elle représente 65 à 70 % du poids total du cartilage et lui donne une résistance compressive. L'eau est étroitement liée à la MEC. Elle occupe l'espace inter-fibrillaire grâce aux protéines de collagènes, de glycoprotéines non collagéniques entre autres et surtout aux PGs.

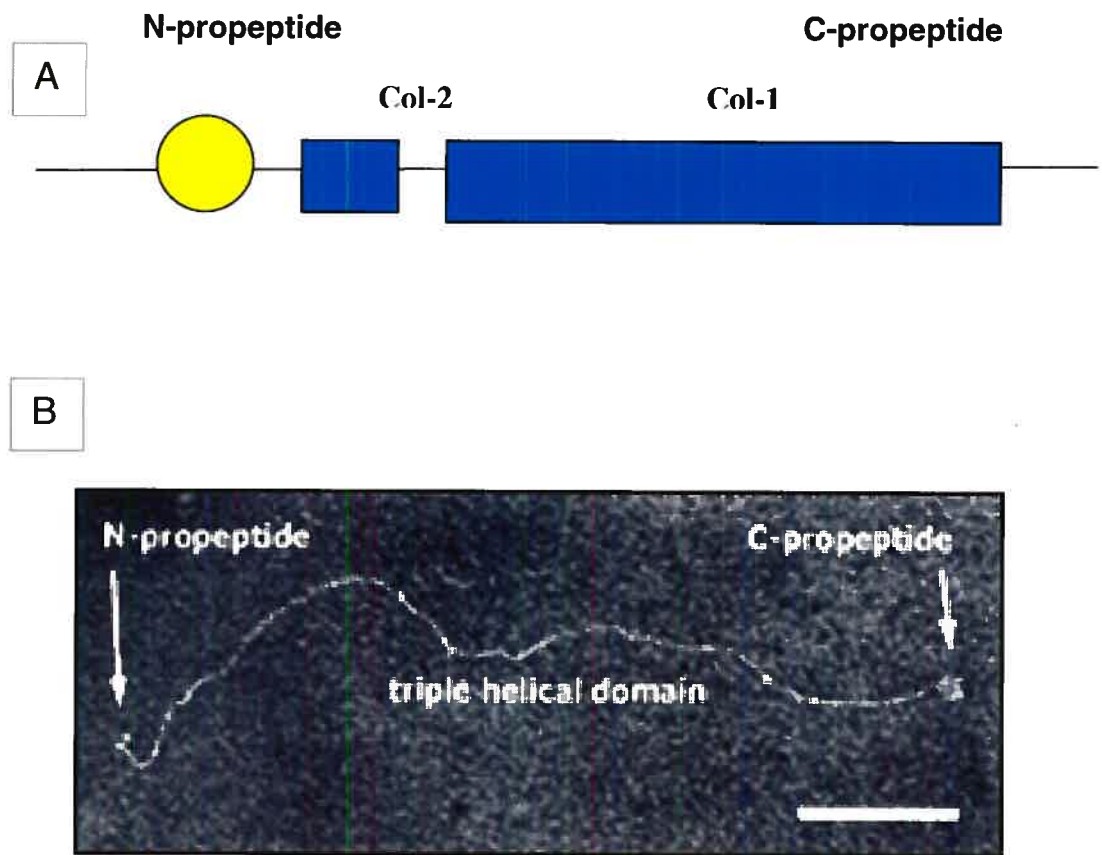
## **1.3 Caractéristiques biochimiques**

Les propriétés biochimiques des molécules de la MEC sont déterminées par leur structure, leurs fonctions et leurs interactions. Les caractéristiques des deux composés les plus abondants de la MEC sont présentées ci-dessous.

### **1.3.1 COLL II**

Le COLL II est la principale protéine du cartilage articulaire hyalin. Il représente 60 % de la matière sèche du cartilage et 50 % des molécules de collagènes présents. C'est une protéine fibreuse, hélicoïdale, composée de 3 chaînes  $\alpha$ -polypeptidiques identiques, torsadées l'une autour de l'autre en une triple hélice pour former des fibres (Bruce et al. 2000).





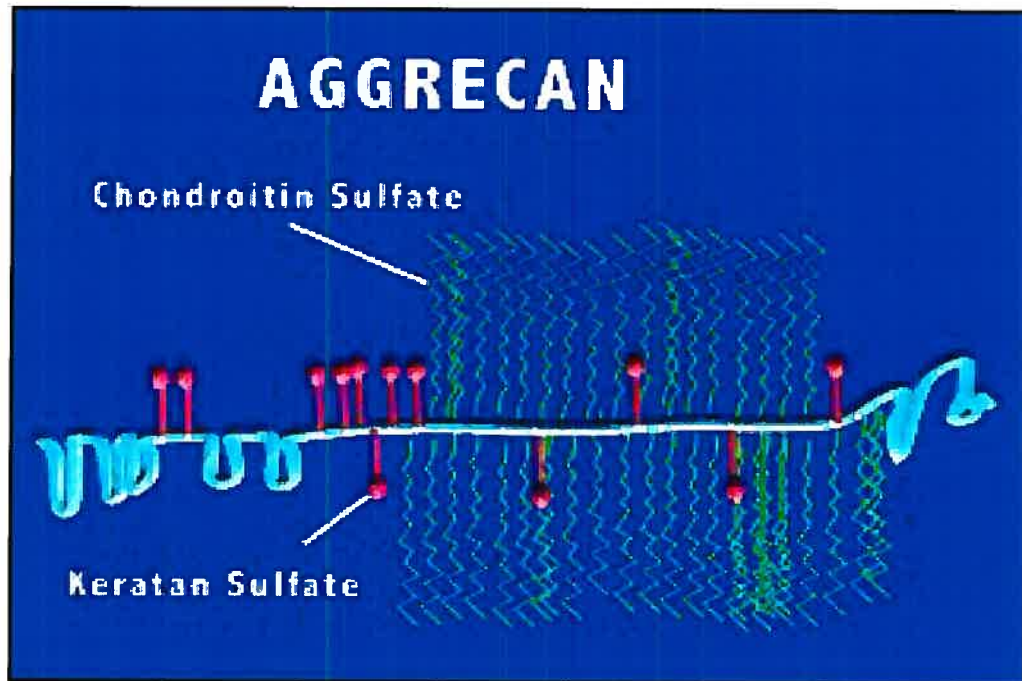
**Figure 2 :** (A) Structure et (B) photo au microscope électronique à balayage d'une molécule de COL2 II (figure provenant de l'internet).

Elle est synthétisée par les chondrocytes sous forme de pro-collagène avec une partie non hélicoïdale en N-terminal Col-2 et une partie hélicoïdale Col-1 en C-terminal (en bleu dans la figure 2). La partie non hélicoïdale est éliminée peu de temps avant son incorporation à la MEC. En outre, le COLL II forme un réseau de fibrilles avec les constituants de la MEC. Sa présence sert à retenir les PGs dans la MEC. Sa densité, son épaisseur et son orientation varient en fonction de sa profondeur dans le cartilage.

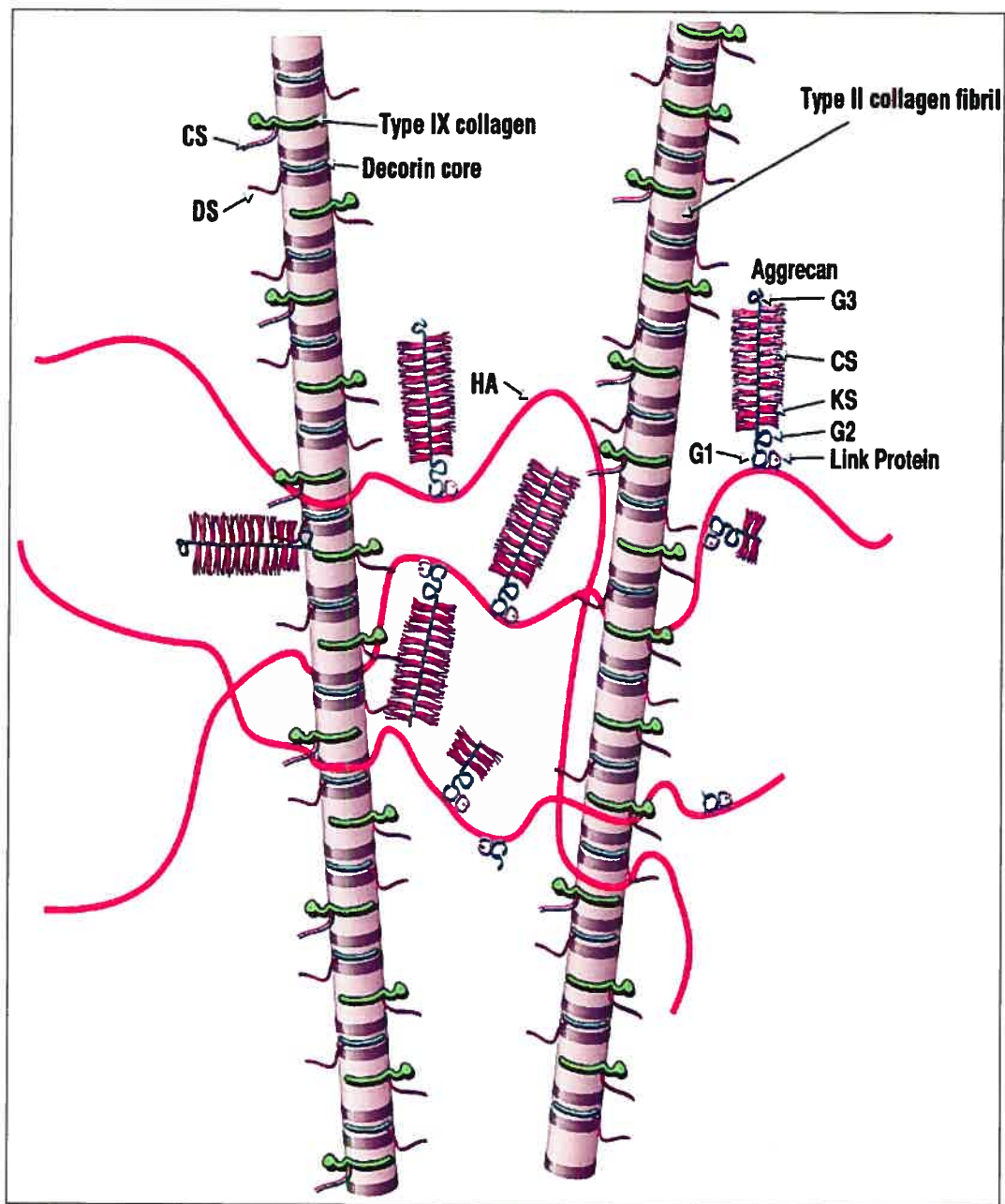
Il existe dans ce tissu d'autres formes de collagènes qui représentent de 5 à 10 % du collagène total connu sous le nom de collagènes mineurs ; ce sont les COLL VI, IX, X et XI. Ces derniers sont associés avec le COLL II pour former un réseau, dont la force de tension essentielle au cartilage augmente avec l'implication des autres constituants.

### **1.3.2 PGs.**

Les PGs sont des protéines très abondantes de la MEC par rapport aux autres protéines. Le monomère de PG est formé d'une protéine centrale à laquelle sont attachées de manière non covalente des protéines très glycosylées, les glycosaminoglycanes (chondroïtine sulfate et keratane sulfate) (Figure 3). Ces monomères à leur tour sont présents dans le cartilage en forme d'agrégats : plusieurs monomères sont rattachés de manière non covalente à une protéine centrale d'acide hyaluronique (Horton et al. 1993). L'ensemble est stabilisé par des protéines de liaison (figure 4). Les PGs ont un poids moléculaire élevé de l'ordre de millions de Dalton et servent à retenir une quantité importante d'eau dans le tissu via leurs chaînes de chondroïtine



**Figure 3 :** Schéma d'un monomère de PG (figure tirée de l'internet).



Poole et al. 2001

**Figure 4:** Schéma d'un réseau de macrofilament de collagènes et d'aggrécanes associé avec l'acide hyaluronique (HA).

sulfate. Les aggécanes sont le type de PG le plus abondant du cartilage hyalin. Associés aux collagènes, ils donnent au cartilage ses propriétés d'élasticité et de compression.

Ainsi, biochimiquement, l'assemblage de ces différentes molécules avec les autres composés du cartilage donne à ce tissu ses caractéristiques particulières de résistance aux forces mécaniques.

#### **1.4 Caractéristiques métaboliques**

Dans le cartilage humain normal, il existe un équilibre constant entre la dégradation (catabolisme) et la réparation (anabolisme) de la MEC. Les chondrocytes maintiennent cet équilibre par le contrôle de l'expression des constituants de la MEC tels que le collagène et les PGs ainsi que par l'expression des métalloprotéinases (MMPs), principales enzymes impliquées dans la dégradation et le remodelage du cartilage OA (Martel-Pelletier et al. 2000).

La régulation de l'expression des constituants de la MEC et des MMPs par les chondrocytes se fait de manière autocrine et paracrine via la production de cytokines, de facteurs de croissance et autres molécules de régulation. Ces facteurs sont produits essentiellement par les chondrocytes, les synoviocytes et les cellules inflammatoires, suite à des interactions MEC / cellules, à des stimuli physiques ou à un stress.

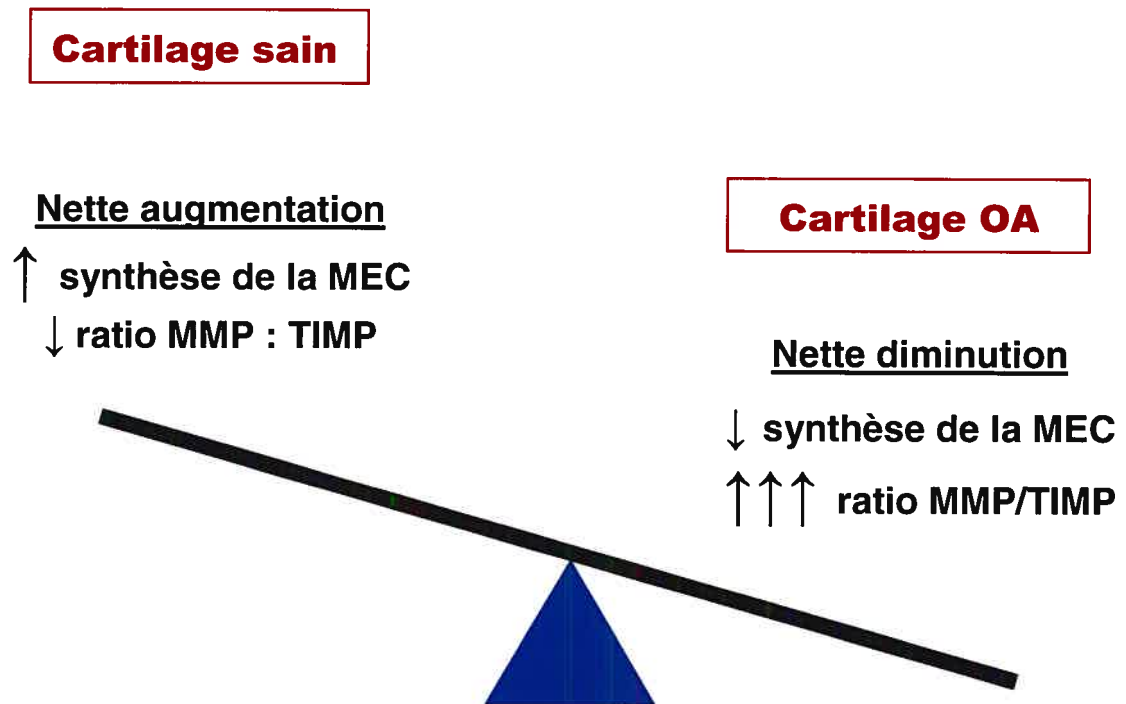
## **2 PATHOPHYSIOLOGIE DE L'OA**

L'OA est une maladie articulaire, la plus répandue parmi les différents types d'arthrites. Elle est la deuxième plus grande cause d'invalidité chez les personnes âgées. Au Canada, elle touche près de 3 millions d'individus soit 1 personne sur 10 (santé Canada 2003). 65 % de la population âgée de 60 ans et plus souffre d'OA et la prévalence de cette maladie augmente avec l'âge (Martel-Pelletier et al. 2000). C'est une maladie idiopathique et multifactorielle. Elle est caractérisée, dans une articulation synoviale, par une altération osseuse en particulier de l'os sous-chondral, par la dégradation du cartilage, la formation d'ostéophytes, l'altération de la capsule ainsi que par l'infiltration du liquide synovial et l'inflammation de la membrane synoviale. Elle fait intervenir un stress oxydatif soutenu par un système anti-oxydant déficient. Plusieurs facteurs de risques ont été retenus pour l'étiologie de l'OA parmi lesquels nous retrouvons l'âge, le sexe, la surcharge pondérale, les traumatismes articulaires, l'obésité, les prédispositions biochimiques et métaboliques (Pelletier et al. 1997). Ils interviennent dans le développement et la progression de l'OA. Nous noterons toutefois que le mécanisme initial du développement de cette maladie est encore inconnu.

### **2.1 Mécanisme de dégradation du cartilage**

Un déséquilibre au niveau de la balance métabolique du cartilage survient dans le phénomène de l'OA (figure 5). Le processus catabolique (l'augmentation des MMPs et une diminution de leurs inhibiteurs tissulaires, TIMPs) prend le

## Remodelage du cartilage



**Figure 5 :** Déséquilibre de la balance anabolique / catabolique lors de l'OA : remodelage du cartilage.

dessus sur le processus anabolique: le taux de réparation devient alors insuffisant pour maintenir l'intégrité de la matrice (Martel-Pelletier et al. 2000). Il en résulte une dégradation des protéines de la MEC et une perte chronique du cartilage.

Ces altérations comportent des modifications morphologiques et structurales au niveau du cartilage articulaire OA. Ceux-ci affectent plusieurs composants du cartilage, incluant les constituants majeurs : les agrégats de PG et les collagènes.

### **2.1.1 MMPs et Agrécanases.**

La dégradation des constituants de la MEC du cartilage est principalement médiée par des MMPs (appelées aussi Matrisines) (Mort et al. 2001; Martel-Pelletier 2001). Ces dernières font partie d'une famille d'endopeptidase zinc dépendante (Woessner et al. 1991). A ce jour, 25 différentes MMPs ont été identifiées (Martel-Pelletier et al. 2001). La famille des MMPs regroupe 5 sous-familles (groupes) qui sont: les collagénases, les stromelysines, les gélatinases, les MT-MMPs (MMP-type membranaire) et d'autres MMPs. Elles interviennent toutes en grande majorité dans le phénomène de l'OA. Comme mentionné ci-dessous, elles sont toutes capables de dégrader les fibres de collagènes mais ont chacune une spécificité pour un type de collagène donné.

Tout d'abord, les **collagénases** sont très importantes dans le remodelage de la MEC. Trois d'entre elles ont été identifiées dans le cartilage articulaire OA humain. Ce sont la MMP-1 (collagénase-1), MMP-8



(collagénase-2) et MMP-13 (collagénase-3) (Martel Pelletier 2001). Elles sont toutes connues pour initier la dégradation des COLL I, II, III et IV (Woessner, 1997). Toutefois, la MMP-13 est l'enzyme la plus importante dans la dégradation du cartilage OA. Reboul et al. (1996) ont démontré qu'elle clive le COLL II 5 à 10 fois plus rapidement comparativement à la MMP-1. Par ailleurs, la MMP-8 est présente en très faible quantité dans le cartilage OA et de ce fait a un effet moindre (Stremme et al. 2003).

Les **stromelysines** (MMP-3,-10,-11) dégradent les PGs, les COLL IV et IX, les fibronectines, l'élastine et la laminine. La MMP-3 participe aussi dans l'activation de la pro-MMP-1, la pro-MMP-13, la pro-MMP-9 et la pro-MMP-8 (Suzuki et 1990, Moilanen et al. 2003, Ogata et al. 1992).

Les **gélatinases** comportent deux types d'enzymes: la gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9). Elles dégradent préférentiellement les fibres de collagène dénaturées, le COLL IV et V, la gélatine, l'élastine et la fibronectine (Martel-Pelletier et al. 2000, Woessner et al. 1991).

Les **MT-MMPs** (MMP-14,-17,-24,-25) ont une séquence transmembranaire et sont impliquées dans l'activation d'autres MMPs (Woessner et al. 1991).

Les **autres MMPs** forment un groupe hétérogène incluant la matrilysine (MMP-7), l'énamelysine (MMP-20) et la métalloprotéinase du macrophage (MMP-12) (Martel-Pelletier et al. 2001; Nagase 1997; Belaaouaj et al. 1995).

Dans un cartilage articulaire sain, les MMPs sont exprimées en petite quantité et sont étroitement modulées afin de garder l'équilibre dégradation-réparation du cartilage. Cependant, la production accrue des MMPs durant le phénomène de l'OA engendre un déséquilibre de la balance. Nous discuterons dans les paragraphes suivant des mécanismes de régulation des MMPs.

#### **2.1.1.1 Les MMPs : mécanismes de régulation**

Les MMPs sont exprimées de manière contrôlée dans différents types tissulaires. Leur régulation se fait principalement au niveau de la voie de signalisation ainsi qu'au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. Plusieurs facteurs tels que des cytokines, des facteurs de croissance et des hormones induisent leurs expressions (Matrisian et al. 1992; Curran et Murray 1999 ; Nagase et Woessner 1999). La MMP-13, principal enzyme de dégradation du COLL II, a un profil de distribution très limité dans les tissus humains normaux. Durant le développement fœtal humain il a été démontré que la production de la MMP-13 par les ostéoblastes et les chondrocytes joue un rôle important dans l'ossification et dans le remodelage squelettique (Stahle-Backdahl et al. 1997). Cependant, dans des conditions pathologiques, la MMP-13 est impliquée dans le développement de plusieurs maladies telles que l'OA et certaines formes de cancer.

Nous porterons dans les parties ci-dessous une attention spéciale à la régulation des MMPs et en particulier à celle de la MMP-13 au niveau de la voie de signalisation ainsi qu'au niveau transcriptionnel et post-traductionnel.

#### **2.1.1.1.1 Voies de signalisation impliquées dans la régulation des MMPs**

La transmission des signaux extracellulaires en signaux intracellulaires est un processus très complexe. Elle requiert l'activité des MAPKs (mitogen-activated proteins kinases), des facteurs clés dans la signalisation (Firestein et al. 1999). Les MAPKs sont activées par phosphorylation via les MAPKKs qui sont activées à leur tour par les MAPKKKs. Ces dernières reçoivent des stimuli via des récepteurs.

Trois voies de signalisation des MAPKs ont été identifiées: ERK 1/2 (extracellular signal-related kinase), JNK/SAP (stress-activated protein kinase /c-jun N-terminal kinase), p38 MAPK. La ERK est activée par des facteurs de croissance, via une voie Ras-dépendante, tandis que la p38 MAPK et JNK sont activées via des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) et par les radicaux libres d'oxygène (ROS) (Firestein et al. 1999). Ces MAPKs activées sont ensuite transloquées au noyau où elles activent des facteurs de transcription. Ces MAPKs jouent un rôle important dans la régulation de gènes comme ceux des MMPs. Des études montrent que la p38 MAPK, JNK et ERK phosphorylent et activent l'AP-1 (Karin et al. 1995). Liacini et al. (2003) ont mis en évidence l'induction de la MMP-13 par le TNF- $\alpha$  via l'activation de ERK, JNK ainsi que l'AP-1 (activating protein-1). De même,

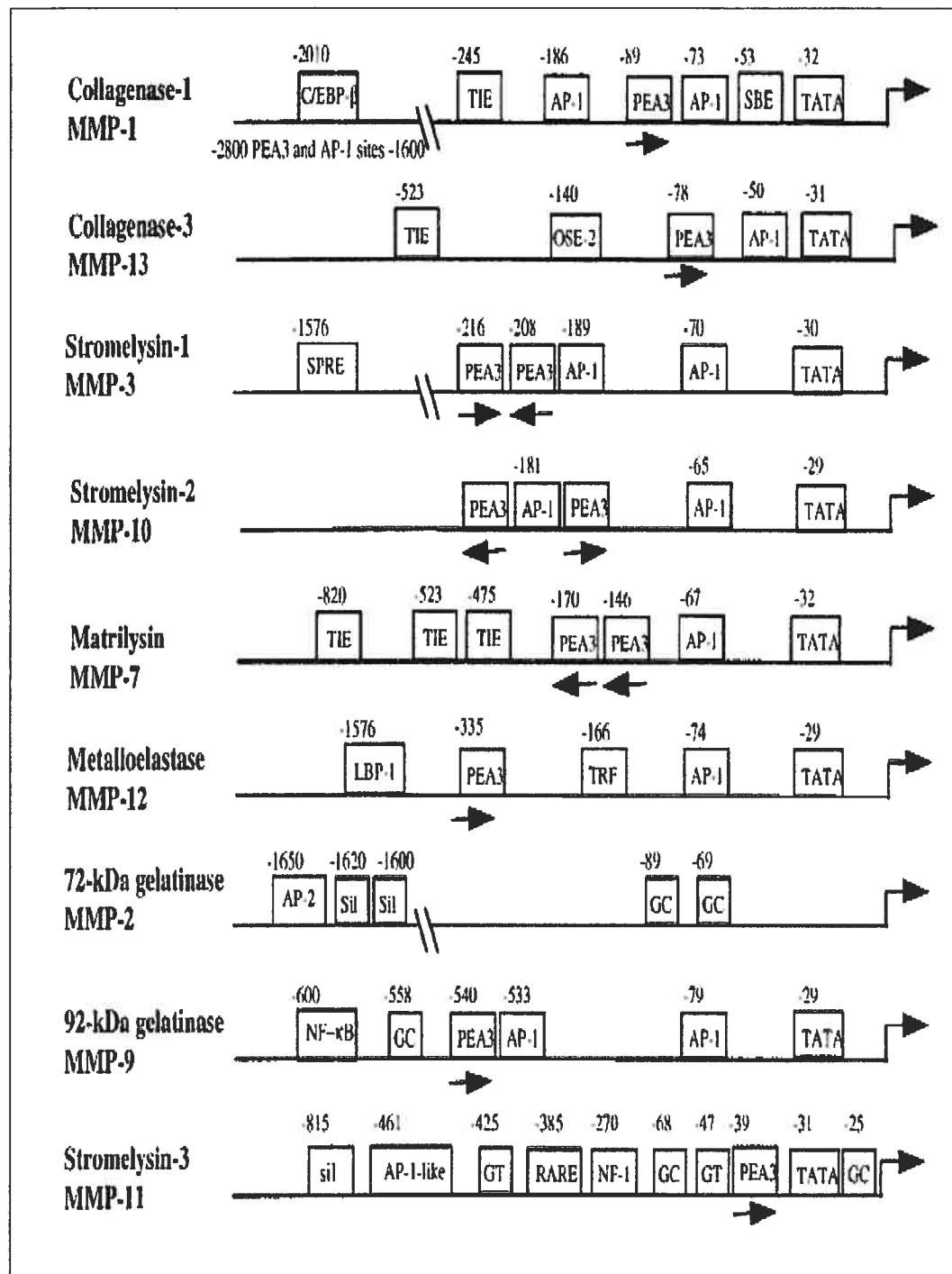
Mengshol et al. (2000) ont démontré que l'induction de la MMP-13 par l'IL-1 $\beta$  se fait via la p38 MAPK, JNK et NF- $\kappa$ B. Une autre étude a révélé que le HGF induit l'expression de la MMP-13 via SAPK / c-Jun et la p38 MAPK (Reboul et al. 2001).

#### **2.1.1.1.2 Régulations transcriptionnelles des MMPs.**

Au niveau transcriptionnel la région proximale du promoteur des MMPs a été bien étudiée. L'analyse de différentes séquences a révélé une certaine homologie entre elles par la présence de plusieurs sites de régulations pouvant lier des facteurs de transcription. On retrouve une boîte TATA et les sites AP-1, PEA-3, OSE-2 (figure 6)

Le site AP-1 se retrouve dans tous les promoteurs des MMPs connues, excepté dans ceux de la gélatinasse 72 kDa (MMP-2) et de la stromelysine-3 (MMP-11). Il apparaît primordial pour l'expression de la plupart des MMPs dont la MMP-13. Ce site est lié aux protéines de la famille Jun et Fos. Il a une importance majeure sur la transcription basale et induite de la MMP-13. Dans les chondrocytes OA, sa mutation abolit à 90% l'expression du promoteur de la MMP-13 (Tardif et al. 2001; Benderdour et al. 2002).

Le site PEA-3 est un autre site important qui se trouve dans la plupart des MMPs à l'exception de la MMP-2. Il lie les oncoprotéines de la famille Ets, et joue un rôle important, non seulement dans la métastase des tumeurs, mais aussi dans le développement du cartilage et de l'os.



Mestermarck et al. 1999

**Figure 6:** Structure des promoteurs des MMPs humaines.

Les protéines se liant à ce site agissent dans certaines cellules dont les chondrocytes, en coopération avec les protéines se liant au site AP-1 pour obtenir une activité maximale du promoteur (Tardif et al. 2001, Benderdour et al. 2002).

La nécessité d'une coopération entre AP-1 et d'autres facteurs pour la régulation de la MMP-13 a été également décrite par d'autres auteurs (Uria et al. 1998, Mengshol et al. 2000, Selvamurugan et al. 2000). Uria et al. (1998) ont montré, dans une lignée embryonnaire, que le TGF $\alpha$  provoquait une coopération entre AP-1 et un autre facteur qu'ils n'ont pas identifié. Un autre facteur de transcription, le Cbfa1 (core binding factor 1) a été décrit comme étant important pour l'expression de la MMP-13 (Jimenez et al. 1999). Il a été démontré que ce facteur joue un rôle dans la formation osseuse (Ducy et al. 1997, Komori et al. 1997). Il en existe plusieurs isoformes qui auraient des fonctions différentes dans la différenciation des ostéoblastes (Harada et al. 1999). Ce facteur jouerait par ailleurs un rôle dans la maturation des chondrocytes (Enomoto et al. 2000).

Dans cette région du promoteur, il a été récemment identifié et caractérisé un autre site, nommé AGRE (pour élément riche en AG). Il agirait comme répresseur de la production basale de la MMP-13 (Benderdour et al. 2002).

### **2.1.1.1.3 Stimulation et inhibition de l'expression de la MMP-13.**

Dans les chondrocytes humains, la production de MMP-13 est induite par les cytokines pro-inflammatoires dont IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et IL-17 (Reboul et al. 1996 ; Benderdour et al. 2002; Moore et al. 2000 ; Shlopov et al. 1997). D'autres facteurs, comme le bFGF, le PDGF-BB et le TGF- $\beta$  stimulent aussi la production de l'enzyme (Tardif et al. 1999). Le TGF- $\beta$  stimule la MMP-13 via le site AP-1 et le site PEA-3 pour une réponse optimale. Benderdour et al. (2002) ont montré l'existence d'une coopération entre AP-1 et PEA-3 lors de la stimulation par des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-17. Fait intéressant, la stimulation par l'IL-1 $\beta$  requiert l'activation de c-Fos tandis que celle de l'IL-17 nécessite celle de FosB. De plus, dans les chondrocytes OA, l'activation de JunB semble être un facteur limitant de la stimulation accrue de la production de la MMP-13 et est indépendante de la stimulation par IL-1 $\beta$  et IL-17 (Benderdour et al 2002).

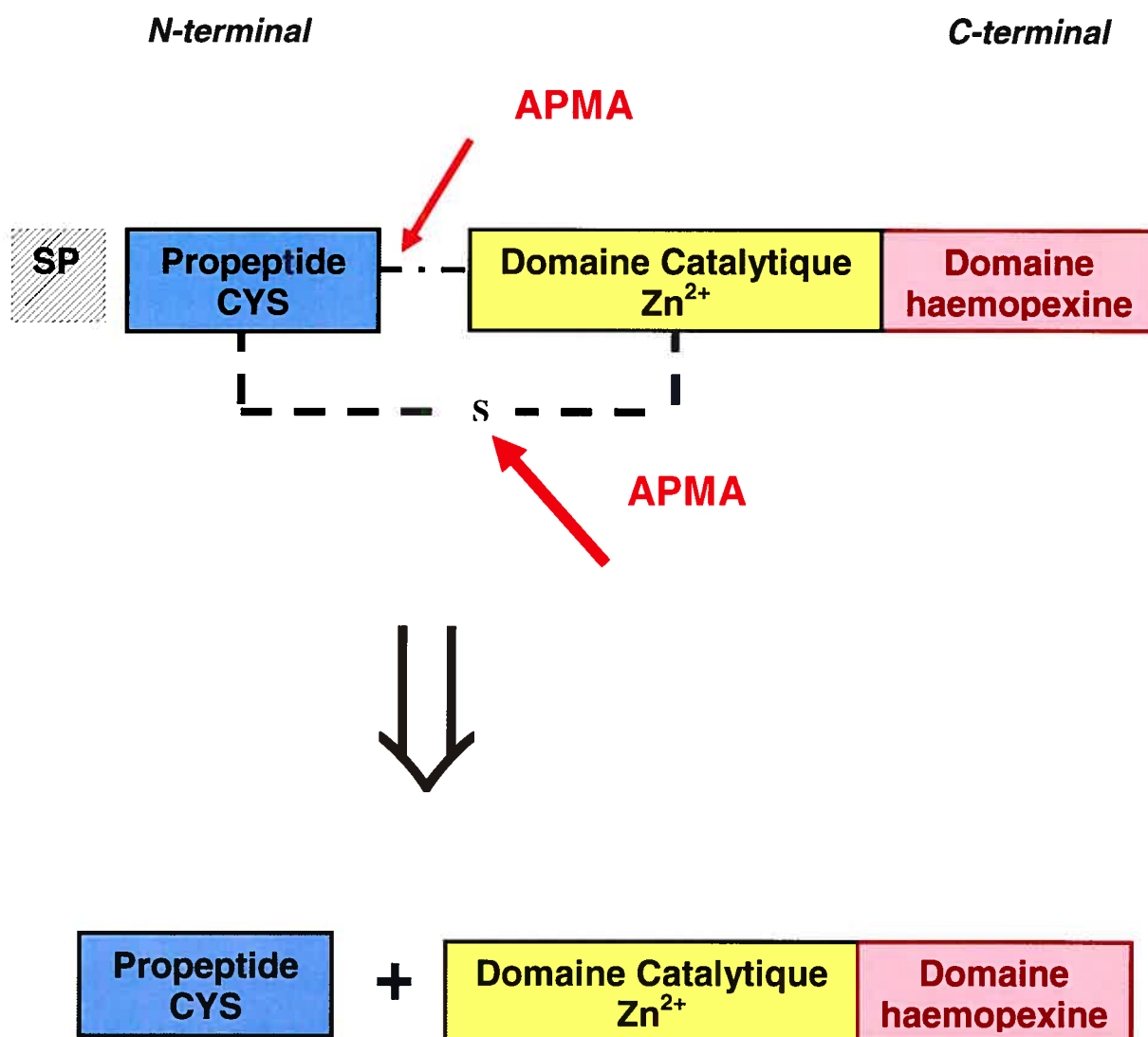
Les glucocorticoïdes inhibent l'expression des MMPs par interférence avec le complexe AP-1. Le récepteur des glucocorticoïdes inhibe l'activité du complexe Jun/Fos en se liant avec c-Jun, ce qui empêche le complexe Jun/Fos de se lier à son site AP-1 (Schroen et al. 1996). L'acide rétinoïque inhibe l'expression de la MMP-1 par l'inactivation de l'AP-1 via la formation d'un complexe entre son récepteur (RAR) et le c-jun empêchant ainsi la formation du complexe Jun/Fos (Schroen et al. 1996). Dans une autre étude, Fahmi et al. (2001) ont démontré que le ligand naturel du "peroxisome proliferator-activated receptor gamma" (PPAR $\alpha$ ) est capable d'empêcher la stimulation de la MMP-13 par IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , et IL-17. Cette inhibition est

attribuée en partie à la répression de la signalisation de l'AP-1. D'autres études ont montré que la production de la MMP-13 dans les chondrocytes est inhibée par les cytokines anti-inflammatoires tels que IL-13, mais leur mécanisme est encore inconnu (Cleaver et al. 2001).

#### **2.1.1.1.4 Régulation post-traductionnelle des MMPs**

Les MMPs sont sécrétées par les chondrocytes dans la MEC sous forme de pro-peptide. Elles sont généralement constituées d'un peptide signal, d'un domaine propeptidique, d'un domaine catalytique comprenant un domaine hautement conservé en zinc et d'un domaine haemopexine situé dans la région C-terminale (Nagase 1997) (figure 7). Van Wart et al. (1990) ont montré que la régulation de l'activation des pro-MMPs se fait selon le modèle de «cystéine switch ». Dans sa forme latente, le domaine propeptidique des MMPs contient un résidu cystéine lié au motif de zinc du domaine catalytique par un pont (Springman et al. 1990) (figure 7). Le domaine Zinc dépendant accessible (non lié au résidu cystéine) est responsable de l'activité protéolytique des collagénases et des stromelysines et donne à chacune sa spécificité de clivage (Sanchez-Lopez et al. 1993). Leur activité est optimale à pH neutre et nécessite du calcium et du zinc. De plus, l'activation des MMPs peut se faire par l'entremise de la plasmine, la trypsine et l'APMA (4-aminophenylmercuric acetate) (Bonanssar et al. 1996). Milner et al. (2001) ont montré que la plasmine est capable d'activer la proMMP-1, proMMP-3, proMMP-9 ainsi que la pro-MMP-13 et de dégrader les PGs.





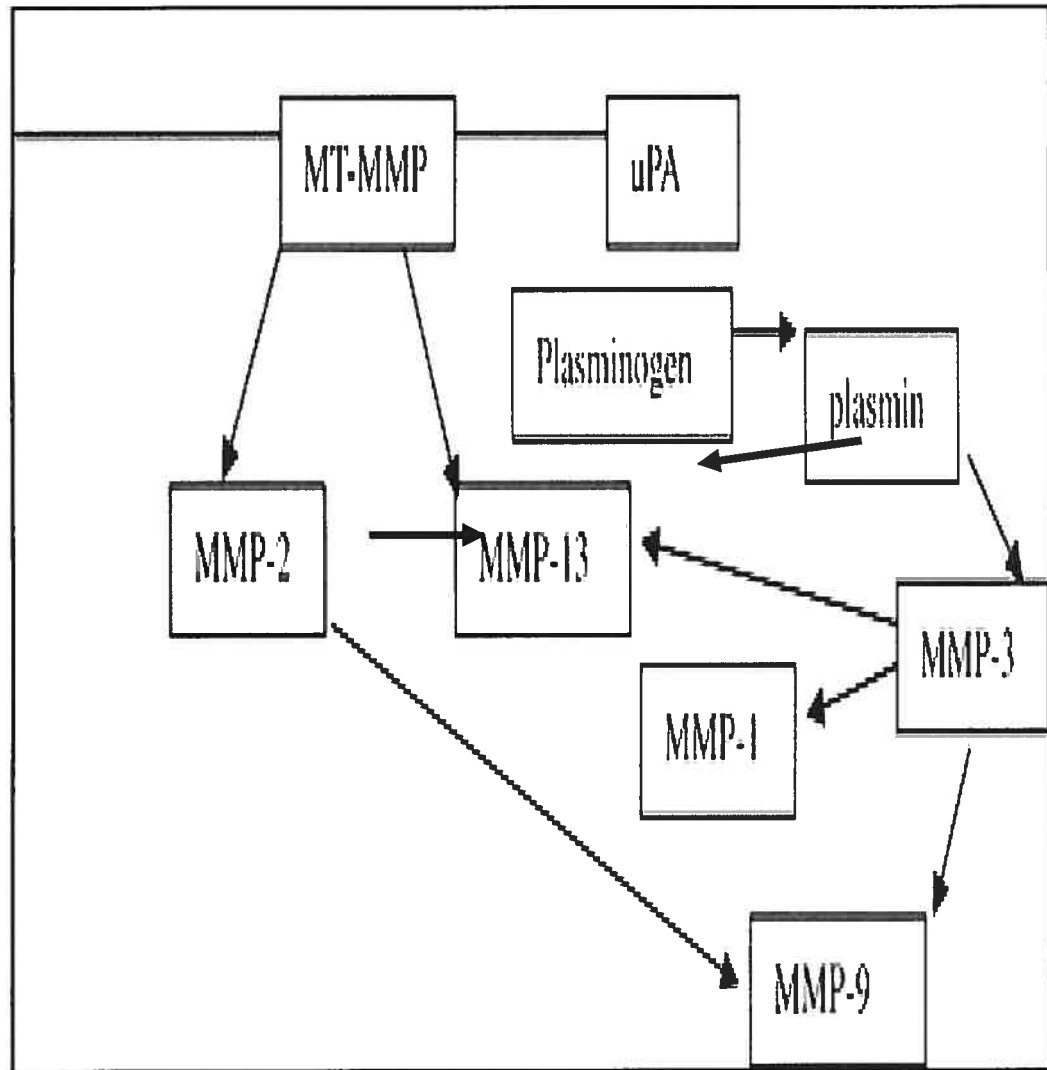
**Figure 7:** Schéma de la structure et du mécanisme d'activation des MMPs par l'APMA.

D'autre part, l'activation de la MMP-13 par l'APMA génère deux fragments de 60 et 46 kDa par clivage du lien entre le domaine propéptidique et le domaine catalytique ainsi que par le clivage du pont entre le résidu cystéine et l'atome de Zinc (figure 7). En outre, les MMPs peuvent aussi activer d'autres MMPs (figure 8; Tableau 1).

L'inhibition de l'activité des MMPs se fait via l' $\alpha$ 2-macroglobuline et les TIMPs (Gomez et al. 1997 ; Martel-Pelletier 2001). Ces inhibiteurs se lient au site actif des MMPs et inhibent leur activité catalytique.

L'  $\alpha$ 2-macroglobuline est une large protéine (750 kDa) produite par le foie. Elle est retrouvée dans les liquides synoviaux d'individus sains et atteints d'OA. C'est un inhibiteur non spécifique des MMPs. Elle empêche la liaison des substrats aux MMPs de manière non spécifique. De part sa grosseur, elle ne peut entrer dans le cartilage. Toutefois, il semblerait qu'elle joue un rôle de désactivation des MMPs dans le liquide synovial et dans la membrane synoviale, plus particulièrement au site inflammatoire.

Les TIMPs sont les inhibiteurs spécifiques des MMPs. Ils sont au nombre de quatre : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 (Baker et al. 2002). Ces inhibiteurs sont synthétisés par les chondrocytes. Cependant, seul le TIMP-1 a été détecté dans le tissu articulaire OA et dans le liquide synovial. Dans des conditions normales, les TIMPs sont synthétisés dans un ratio de 1 :1 avec les MMPs. Leur capacité d'inhibition se fait à partir d'une liaison non covalente avec le site actif des MMPs, l'ion Zinc du domaine catalytique.



Curran et Murray 1999 (modifié).

**Figure 8:** Schéma de la cascade d'activation des MMPs par les MMPs.

<b>Activateurs des MMPs</b>	<b>MMPs activées</b>
<b>MMP-MT1</b>	<b>MMP-13 MMP-2</b>
<b>MMP-13</b>	<b>MMP-9</b>
<b>MMP-10</b>	<b>MMP-8</b>
<b>MMP-3</b>	<b>MMP-1 MMP-13 MMP-9 MMP-7</b>
<b>MMP-7</b>	<b>MMP-1 MMP-9</b>

**Tableau 1:** Activation des MMPs par les MMPs.

### 2.1.2 Mécanisme de dégradation du collagène par les MMPs

Dans la pathologie de l'OA, il a été suggéré que l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , stimule la dégradation des aggrécans par des aggrécinases. Le processus de la dégradation du cartilage commence par le clivage du domaine NC4 de la chaîne  $\alpha_1$  (IX) non collagénique par les aggrécinases. Il en résulte une perte du domaine COL2 (collagénique) de la chaîne  $\alpha_1$  (IX). Après cette phase initiale, le COLL II devient accessible aux collagénases. Les collagénases dont principalement la MMP-13, clivent le COLL II au niveau de sites spécifiques de leurs 3 chaînes  $\alpha$ -polypeptidiques (figure 9). Le premier site de clivage se situe au Gly<sup>775</sup>–Leu/Ile<sup>776</sup> (Miller et al. 1976). Ce clivage engendre deux fragments de collagènes (néoépitopes) qui se dénaturent pour former des gélatines non-hélicoïdales. Les gélatines peuvent être clivées ensuite par d'autres MMPs. Billingham et al. (1997) ont démontré l'existence d'un deuxième site de clivage Gly<sup>778</sup>-Gln<sup>779</sup> sur un des néoépitopes formés (figure 9). De plus, ils montrent que ce deuxième clivage est aussi médié par la MMP-1, la MMP-8 et principalement la MMP-13. Par ailleurs, le COLL II est connu pour avoir un « turnover » lent. La dégradation du COLL II et parallèlement des aggrécans dans le cartilage entraîne donc des dommages irréparables.

### 2.1.3 Les cytokines et le stress oxydatif dans l'OA

Deux cytokines pro-inflammatoires ont été identifiées comme modulateur de la dégradation de la MEC : l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (Martel-pelletier

**...G<sub>766</sub>-A-E-G-P-P-G-P-Q-G-L-A-G-Q-R-G-I-V-G<sub>784</sub>...**  
 (Portion de la séquence primaire d'un polypeptide de COLL II)

1<sup>er</sup> clivage du COLL II par les collagénases et formation de néoépitoques (→ gélatines).

**G-A-E-G-P-P-G-P-Q-G<sub>775</sub>**

**L<sub>776</sub>-A-G-Q-R-G-I-V-G**

2<sup>eme</sup> clivage du COLL et formation de néoépitoques.

**L-A-G<sub>778</sub>**

**Q<sub>779</sub>-R-G-I-V-G**

**Figure 9:** Mécanisme de formation des néoépitoques de COLL II  
 via l'action des collagénases.

et al. 2000). Ces cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées par la membrane synoviale et diffusent dans l'articulation jusqu'au cartilage. A ce site, elles stimulent la sécrétion de facteurs cataboliques par les chondrocytes tels que les protéases et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Martel-Pelletier et al. 1999). L'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  médient plusieurs processus cellulaires pathologiques : Elles augmentent la synthèse des MMPs (Liacini et al. 2003, Vincenti et al. 1994), inhibent la synthèse des TIMPs, des collagènes et des protéoglycanes par les chondrocytes. Elles stimulent aussi la production de médiateurs cataboliques inflammatoires tels que l'oxyde nitrique (NO), la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et les radicaux libres d'oxygène (ROS) (Henrotin et al. 2003).

Il existe d'autres cytokines qui interviennent dans le catabolisme du cartilage OA incluant l'IL-17. Jovanovic et al. (2000) ont montré que cette dernière stimule la production des cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  via les macrophages. De plus, dans les chondrocytes humains OA, l'IL-17 induit la production du NO et l'expression de la MMP-13 via l'AP-1 (Benderdour et al. 2002; Attur et al. 1997 ; Martel-Pelletier et al. 1999).

Les cytokines sont en outre capables d'augmenter le niveau du stress oxydatif via la production de ROS (Heinrich et al. 2001). Dans l'OA, les ROS sont produits de manière incontrôlée dans l'articulation et contribuent significativement à la progression de la pathologie. De plus, ils jouent un rôle d'intermédiaire des voies de signalisation du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  dans les chondrocytes OA (Mendes et al. 2003 ; Lo et al. 1996). Ces oxydants sont

capables de dégrader le cartilage via l'oxydation des composants de la MEC ou via des modifications post-traductionnelles (MPT) des MMPs par le mécanisme de « cysteine switch » avec ou sans clivage protéolytique (Gu et al. 2002; Burkhardt et al. 1986). Ils modifient l'équilibre anabolique-catabolique en diminuant les TIMPs ainsi que d'autres inhibiteurs protéiques (Shabani et al 1998).

La contribution du NO dans la dégradation du cartilage articulaire OA est réalisée par son action sur les macromolécules de la MEC et sur l'expression des enzymes destructrices et/ou inhibitrices. Il est produit dans le cartilage en grande quantité suite à l'induction de l'expression et de la synthèse de NO synthétase inductible (iNOS) via les cytokines pro-inflammatoires. Il a été démontré que l'IL-1 $\beta$  augmente la dégradation du cartilage via la production du NO. Murrel et al. (1995) ont montré, qu'*in vitro* le NO augmente la synthèse et l'activation des MMPs dans les chondrocytes et le cartilage articulaire OA. Par contre, *in vivo*, ils suggèrent que cette molécule inhibe sélectivement l'expression du iNOS. Ceci entraîne une diminution de la synthèse des MMPs et confère ainsi une protection des tissus articulaires OA.

Les ROS et le NO agissent sur les acides gras polyinsaturés de la membrane et entraînent la production d'aldéhydes, via le processus appelé la peroxydation lipidique (LPO). Les deux aldéhydes produits en majorité dans ce processus sont le malondialdéhyde (MDA) et l'hydroxynonéanal (HNE). Dans la littérature, des études ont montré la production de ces aldéhydes par

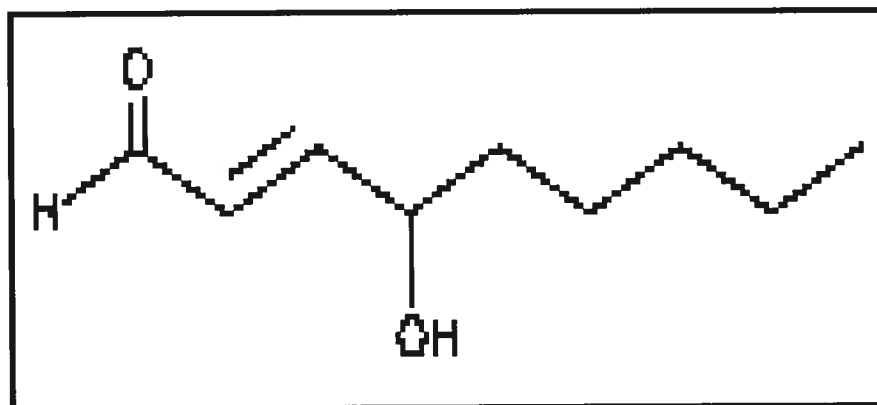


les synoviocytes OA *in vitro* (Grigolo et al. 2003). De plus, Tikunova et al. (2000 ; 2003) ont suggéré que le MDA contribue à la dégradation du cartilage OA par son action oxydante sur les macromolécules de COLL II. L'implication du HNE dans la progression de cette pathologie ainsi que sa production dans le cartilage OA ne sont pas connues.

### **3 LE 4-HYDROXYNONENAL (HNE)**

#### **3.1 Formation et caractéristiques du HNE**

Les aldéhydes sont produits lors du processus de la peroxydation des acides gras insaturés de la membrane. Similaires aux ROS, les aldéhydes sont des électrophiles qui se lient aux groupes nucléophiles des protéines, des (amino) phospholipides et des acides nucléiques. Leur demi-vie relativement plus longue les rend candidats pour la propagation des dommages du stress oxydatif. Parmi les aldéhydes, le HNE est considéré comme l'aldéhyde le plus réactif grâce à ses doubles liaisons  $\alpha$  et  $\beta$  (figure 10). Cette molécule était longtemps un sujet de controverses, on la considérait parfois comme un messager toxique secondaire et parfois comme simplement un marqueur des dommages tissulaires excessifs (Esterbauer et al. 1991). Cette situation a récemment changé depuis que le HNE a été identifié comme un constituant normal des membranes tissulaires chez les mammifères. De plus, plusieurs études considéraient le HNE comme un modulateur pathophysiologique grâce à ses capacités d'induire les voies de signalisation (p38 MAPK et JNK), de stimuler l'activité transcriptionnelle et de modifier les protéines comme nous le verrons plus loin (Bennaars-Eiden et al. 2002; Eaton et al. 1999; Poli



**Figure 10:** Structure de la molécule du HNE montrant la double liaison  $\alpha$  et  $\beta$ .

et al. 2000; Uchida et al. 1999; Chen et al 2001, Leonarduzzi et al. 2004).

### **3.2 Modes d'action du HNE**

#### **3.2.1 HNE & Protéines: modifications post-traductionnelles.**

La double liaison  $\alpha$  ou/et  $\beta$  du HNE réagit facilement avec des acides aminés spécifiques de protéines et des co-enzymes par l'addition de Michael : le groupement sulfhydryl de cystéines et de l'acide lipoïque, le groupement  $\alpha$ -amine de la lysine et la fonction imidazol de l'histidine. Ces protéines chimiquement modifiées possèdent toujours une fonction carbonyle qui subit une réaction secondaire avec les résidus lysine et histidine pour former une base de Schiff (Cohn et al. 1996; Frigeut et al. 1997). L'accumulation des protéines modifiées par le HNE, qui sont utilisées comme des marqueurs du stress oxydatif, dépend de plusieurs facteurs en plus de la magnitude du stress oxydatif. On peut citer (i) la capacité intrinsèque de la cellule à métaboliser le HNE en des produits non toxiques (Ishikawa et al. 1986), (ii) sa réduction en 1-4-dihydroxynonene (DHN), (iii) son oxydation en acide 4-hydroxynonenique (HNA), et (iv), sa conjugaison avec GSH suivit de son exportation (figure 11). La modification des protéines par le HNE les rend susceptible à la dégradation. (Bulteau et al. 2001; Davies et al. 1987). La liaison du HNE est irréversible sauf dans certaines conditions en présence des antioxydants (Bosch-Morell et al. 1999).

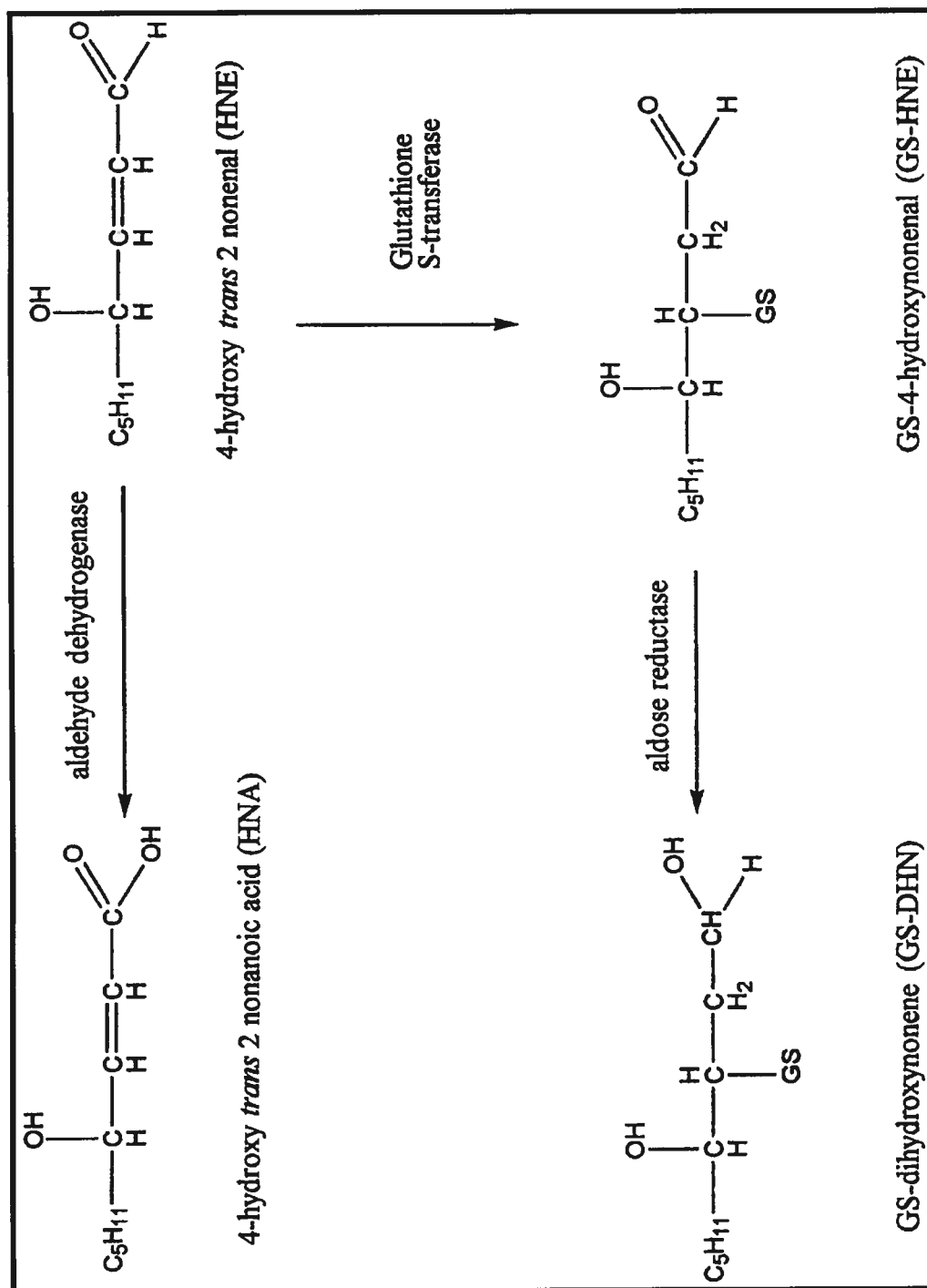
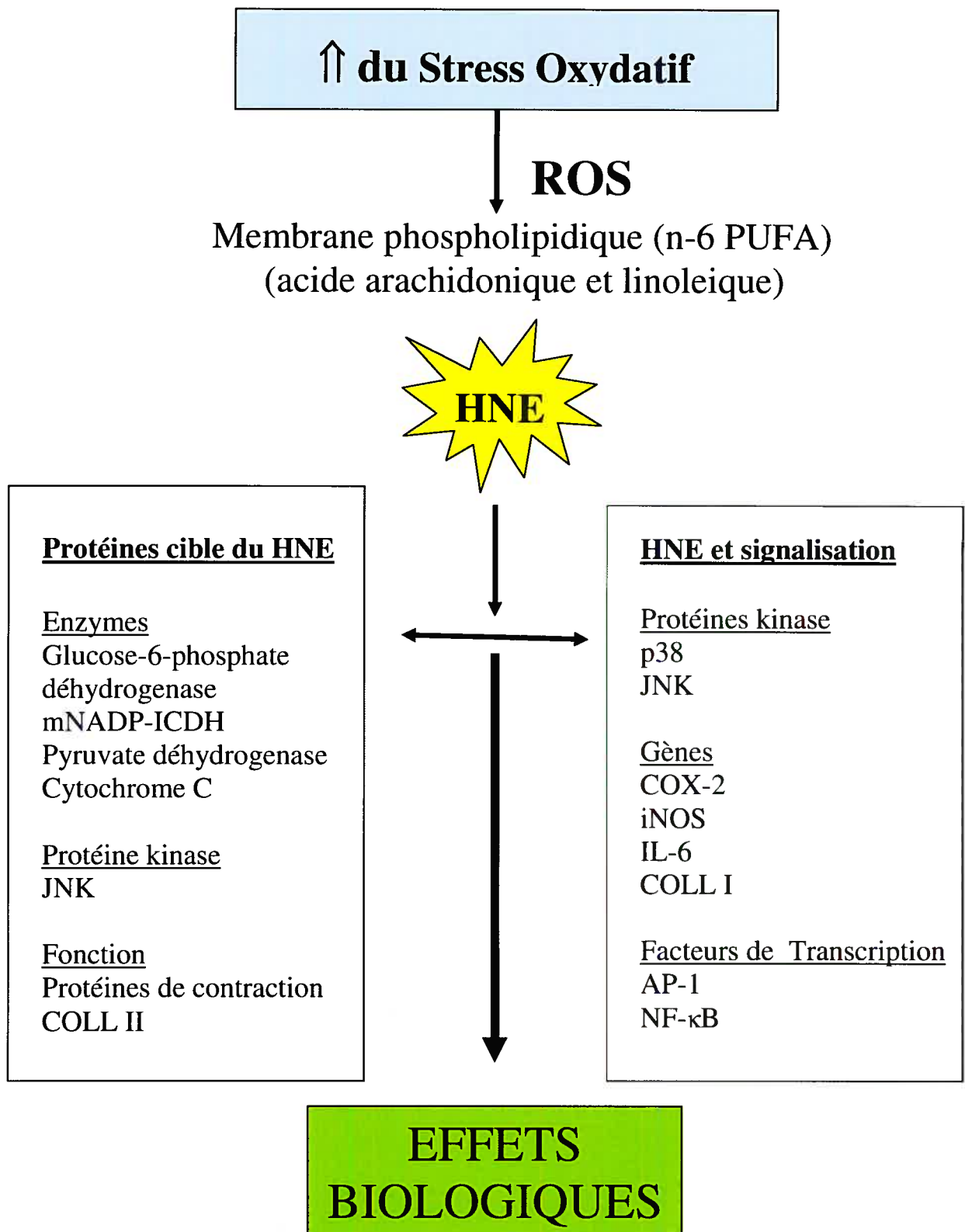


Figure 11 : Les intermédiaires du métabolisme du HNE.

Plusieurs études ont démontré que les composantes de la MEC sont des cibles du HNE. Paradis et *al.* (1997) ont été les premiers à identifier les fibres de collagènes modifiées par le HNE et le MDA dans le foie. Dans les chondrocytes articulaires de lapins, Tikou et *al.* (2000) ont démontré que la production de MDA par les cellules médient l'oxydation de collagènes cartilagineux. Ces auteurs proposent que les modifications oxydatives, *in vivo*, du collagène par les aldéhydes peuvent entraîner l'altération biochimique et biophysique du cartilage. Ceux-ci les rendraient sujet à la dégradation et par conséquent initierait les changements observés dans l'OA. Dans l'OA, l'origine exacte de la production du HNE, à savoir les synoviocytes ou les chondrocytes dans les tissus cartilagineux, est mal définie. Toutefois, Grigolo et *al.* (2003) ont démontré que les synoviocytes OA produisent une plus grande quantité de complexe HNE + MDA comparativement aux cellules normales. Ces aldéhydes (HNE + MDA) sous leur forme libre ont été détectés dans l'extrait cellulaire de synoviocytes par un dosage colorimétrique en utilisant un kit commercial. La démonstration de l'accumulation de complexes d'aldéhydes / protéines dans le tissu articulaire de patients atteints d'OA est une étape importante dans la compréhension du processus catabolique et inflammatoire induit par les produits dérivés de la LPO.

### **3.2.2 HNE & voie de signalisation**

Le HNE semble initier des cascades de signalisation après 5 minutes d'incubation. Leonarduzzi et *al.* (2004) ont mis en évidence le rôle du HNE



**Figure 12 : Modes d'action du HNE.**

dans l'activation de la famille des MAPKs. La modulation des voies de signalisation des MAPKs par le HNE est particulière et dépend du type cellulaire (figure 12).

L'activation des JNKs par le HNE a été démontrée par Parola et al. (1998) dans des cultures primaires de cellules hépatiques humaines incubées avec du HNE à 1  $\mu$ M. Cette activation est associée avec la formation des complexes HNE-p46 et HNE-p54, deux isoformes de JNKs. L'interaction du HNE avec les résidues HIS provoque une translocation de JNKs au niveau du noyau ainsi que son activation. Cela suggère que les kinases en amont de la cascade de JNKs ne sont pas impliquées et que ces isoformes transloqués dans le noyau n'ont pas été phosphorylés (Awasthi et al. 2003). Camandola et al. (2000) ont démontré une augmentation de l'activité de l'AP-1 liée à l'ADN dans les cultures de neurones corticaux de rat exposés à des concentrations de HNE pro-apoptotiques.

Récemment, l'utilisation de neurones sympathiques déficients pour le gène JNK3 a permis à Bruckner et Estus (Bruckner et al. 2002) de démontrer que le JNK3 contribue à engendrer la mort du neurone via la production du HNE. Le HNE (1  $\mu$ M) induit la phosphorylation de c-Jun, la synthèse du c-jun et l'apoptose caspase dépendante dans les neurones sympathiques. Dans une autre étude, Kumagai et al (2000) ont montré dans les cellules d'épithélium du foie de rat RL34 que le HNE est capable d'induire la cyclooxygénase-2 (COX-2) via l'activation de la p38 MAPK ainsi que des MEK 3 / 6 en amont de la p38 MAPK.

Ruel et al. (1998) ont traité les cellules musculaires aortiques de rat avec 1 à 2.5  $\mu$ M de HNE. Ils ont observé une forte activation de ERK1/2, d'AP-1 et une stimulation du facteur c-jun. Ces données indiquent que le HNE pourrait être impliqué dans la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses par l'induction de signaux mitogènes, ce qui pourrait être important dans l'athérosclérose (Ruef et al. 1998). De même, 25  $\mu$ M de HNE induit la sécrétion de fibronectine par les fibroblastes du poumon humain (IMR-90) suivie de l'activation marquée de ERK 1/2, comparativement à la p38 MAPK et JNKs.

En outre, la voie de signalisation de transduction du NF- $\kappa$ B est une autre voie à la réponse au stress et aux cytokines pro-inflammatoires. La dégradation de l'unité inhibitrice I $\kappa$ B suite à la phosphorylation de son résidu sérine est nécessaire à l'activation du NF- $\kappa$ B. Cette étape est médiée par un complexe I $\kappa$ B kinase (IKK). Le traitement des cellules musculaires lisses avec le HNE prévient l'activation du NF- $\kappa$ B (Hattori et al. 2001). Cette dernière semble provenir d'une interaction directe entre le HNE et le complexe IKK (Ji et al. 2001). Cependant, des études conflictuelles indiquent que le HNE induit l'activation du NF- $\kappa$ B dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Ruef et al. (2001) démontrent que le HNE cause l'activation du NF- $\kappa$ B par phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  via tyrosine kinase sans dégradation. La signification de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  au niveau de la tyrosine au lieu des résidus sérines par les signaux de transduction n'a pas encore été élucidée. Les



auteurs indiquent que l'activation du facteur NF- $\kappa$ B est fonction de la concentration du HNE et du type cellulaire.

#### 4 OBJECTIF GÉNÉRAL

Cette étude a pour but l'identification de nouveaux facteurs susceptibles d'être impliqués dans le développement et/ou la progression des lésions du cartilage. De nombreuses études ont montré que le stress oxydatif contribue à la pathogenèse de l'OA causée par un déséquilibre entre le niveau intracellulaire des ROS et celui des antioxydants. Dans différents tissus, l'effet cytotoxique des ROS se traduit en partie par la production des aldéhydes toxiques lors du processus de LPO. Nous proposons dans cette étude d'investiguer le rôle des aldéhydes, en particulier le HNE, dans le cartilage humain OA. Son taux est plus élevé dans le plasma et la membrane synoviale des patients atteints d'OA. Le HNE est considéré comme l'aldéhyde le plus cytotoxique et génotoxique grâce à ses doubles liaisons  $\alpha$  et  $\beta$ . Il est capable de former des complexes avec les biomolécules telles que les protéines et l'ADN. Depuis quelques années, des études décrivaient que ces aldéhydes auraient un rôle dans la modification de la MEC grâce à leurs propriétés biologiques à se lier au collagène, ce qui rend cette protéine plus susceptible à la digestion par les collagénases. Par ailleurs, le HNE a été décrit comme un facteur modulateur du signal de transduction par l'activation des voies de signalisation des protéines kinases MAPK (p38 MAPK, JNK). À partir de ces données, nous proposons d'étudier le rôle essentiel de cet aldéhyde dans le développement de l'OA. Nous nous proposons d'étudier les

mécanismes biochimiques et moléculaires du HNE impliqué dans la dégradation du cartilage OA via la modulation du COLL II et de la MMP-13 au niveau transcriptionnel et post-traductionnel.

## 5 HYPOTHÈSES

Des données récentes montrent que la production des aldéhydes de la LPO par des chondrocytes de lapin, contribue à la modification et à la dégradation du collagène. Cependant le rôle de ces aldéhydes dans le cartilage OA est inconnu. Leurs taux dans les fluides synoviaux sont augmentés lors du développement de l'arthrose sans que l'on ne sache si ces aldéhydes en sont la cause ou une conséquence. Le HNE, qui est l'objet de notre étude, est l'aldéhyde le plus réactif comparé aux autres aldéhydes. Notre hypothèse proposée est que le HNE pourrait jouer un rôle dans la pathophysiologie de l'OA humaine en tant que facteur favorisant le catabolisme du cartilage OA (i) par la modification du COLL II qui le rend plus susceptible à la dégradation et/ou (ii) par des mécanismes moléculaires régissant la régulation et le turnover du COLL II et de la MMP-13. Nous allons étudier le cartilage articulaire du genou chez les patients atteints d'OA pour l'identification du complexe HNE / COLL II et mesurer la susceptibilité de ce complexe à la dégradation par la MMP-13. D'autre part, nous étudierons l'effet du HNE sur les voies de signalisation de la MMP-13 et sur les modifications post-traductionnels de cette enzyme par le HNE.

## **CHAPITRE II :**

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## **1. Sélection des spécimens**

Des spécimens de liquides synoviaux et de cartilages humains ont été prélevés à partir de tissus humains sains à l'autopsie ( $59 \pm 11$  ans, moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=5$ ) et de tissus de patients atteints d'OA ( $69 \pm 8$  ans) ayant subi un remplacement total du genou ( $n=28$ ). Les diagnostics ont été faits suivant les critères du Collège Américain de Rhumatologie (Altman et al. 1986). Les patients ayant subi une injection intra articulaire de corticostéroïde ou d'acide hyaluronique jusqu'à six mois avant l'étude ont été exclus. Chaque cartilage OA recouvrant la partie osseuse (du condyle fémoral et du plateau tibial) a été obtenu dans des conditions stériles et soigneusement disséqué. Le cartilage fibreux a été exclu.

## **2. Conditions de culture**

Les spécimens de cartilage sont rincés, disséqués et les cellules libérées comme décrit préalablement (Benderdour et al. 2002). Brièvement, les spécimens de cartilage sont pris de la surface osseuse du genou à l'exception des tissus de réparation mésenchymale et de l'os sous-chondral. Les morceaux de cartilage sont digérés à  $37^{\circ}\text{C}$  dans du milieu de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) contenant 1 mg/ml de pronase (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) pendant 1 h, suivie par une deuxième digestion au collagénase de type IV à 2 mg/ml (Sigma) pendant 6 h auquel 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) (Gibco BRL) et 100 U / pénicilline / 100  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine (Gibco BRL) ont été rajoutés. Après la digestion du cartilage, les cellules sont isolées et cultivées

à haute densité dans des flacons jusqu'à confluence dans du 10% de FBS/DMEM à 37°C dans une atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub> et 95 % air. Les chondrocytes de premier passage sont cultivés à haute densité dans des puits à raison de 10<sup>5</sup> / cm<sup>2</sup> comme décrits préalablement. 24 heures avant chaque expérience, le milieu de culture est remplacé par un milieu contenant 1% de FBS. Les manipulations sont effectuées dans ce milieu avec les différents facteurs étudiés.

### **3. Concentration tissulaire et cellulaire des complexes HNE/protéine**

La concentration tissulaire totale des complexes HNE/protéine est mesurée dans le liquide synovial et dans des extraits cellulaires de chondrocytes incubés durant 48 heures avec des concentrations croissantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3-morpholinosydnonimine (SIN), ou TNF $\alpha$  par la méthode d'ELISA en utilisant un anticorps anti-HNE de souris. Les complexes HNE / albumine de sérum bovin (BSA) sont utilisés comme standard tel que décrit par Benderdour et al. (2003). Brièvement, afin de préparer le standard, la BSA à raison de 5 mg/ml est dissoute dans 50 mM de solution tampon de phosphate salin (PBS), et incubée à 37°C durant 1h en présence de 0.1 mM de HNE. Afin d'éliminer le HNE libre, la solution HNE / BSA est filtrée et lavée 4 fois avec du PBS à l'aide d'un filtre de centrifugation 10 000 MWCO (Millipore). Un volume de 100  $\mu$ l de standard HNE / BSA ou d'échantillons sont déposés dans les puits de micro-plaques (VWR International) incubés pendant 16 h à 4° C. Les puits sont par la suite lavés 4 fois avec du PBS puis saturés par

l'ajout de 200  $\mu$ l de la solution bloquante (5% BSA et 5% de FBS) durant 4h à la température de la pièce. La solution bloquante est ensuite enlevée et remplacée par 200  $\mu$ l d'anticorps monoclonal anti-HNE (dilué 1 :1000 dans 0.05 % de Tween-PBS). Les plaques sont incubées à nouveau durant 16h à 4°C. Les puits sont ensuite lavés 4 fois avec la solution Tween-PBS et 200  $\mu$ l d'anticorps de chèvre anti-IgG conjugué ont été rajoutés (anti-lapin IgG – HRP; 1 :50,000 Jackson ImmunoResearch). Les plaques sont alors incubées durant 2 h à la température de la pièce. Après 4 lavages avec le Tween-PBS, les puits sont mis en contact avec une solution contenant de l'o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma) et incubés pendant 10 à 20 minutes à température de la pièce. La réaction est ensuite stoppée avec 50  $\mu$ l de 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'absorbance est mesurée par l'utilisation d'un lecteur universel de microplate EL800 (BIO-TEK instruments, Winooski, VT, USA).

#### **4. Détermination des fragments de COLL II**

Les expériences sont conduites avec des explants de cartilage OA en présence et en absence de concentrations croissantes de HNE (de 0 à 100  $\mu$ M) durant 5 jours. Ensuite, les milieux de culture sont récupérés et les explants de cartilage homogénéisés dans un milieu contenant 50 mM de Tris HCL, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.05% de Brij 35, 2M de hydrochloride guanidine, pH 7.5 comme décrit par Roy-Beaudry et al. (2003). Après centrifugation, les extraits sont dialysés excessivement avec 50 mM de tris HCL, pH 7.5 puis collectés pour l'expérience. Le dosage des fragments de COLL II formés

dans le cartilage a été réalisé à l'aide d'un kit commercial (IBEX, Montréal, Qc).

## **5. Immunoprecipitation**

Pour la détection des complexes HNE / COLL II *ex vivo*, les explants de cartilage OA (~150 mg) ont été incubés pendant 5 jours dans 1% de FBS / DMEM en présence et en absence de 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M de SIN, 10 ng de TNF $\alpha$ , et ou 20  $\mu$ M de HNE comme contrôle positif. Ensuite, les explants ont été homogénéisés sur glace dans un milieu de 1 ml de RIPA (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100) complété avec des inhibiteurs de protéase et du 2M d'hypochloride de guanidine. Les extraits ont été dialysés excessivement avec du milieu de RIPA à 4°C sous agitation. 200  $\mu$ g d'extraits tissulaires ont été pré-incubés avec la protéine G (Sigma) à 4°C sous faible agitation et ensuite immunoprécipités avec un anticorps polyclonal anti-COLL II humain (1 :500, Calbiochem) dans le milieu RIPA. Après une incubation de 16 h à 4°C sous faible agitation, la protéine G a été ajoutée et le tout incubé pendant 2 heures à la température de la pièce puis centrifugé. La résine a été lavée trois fois avec un tampon RIPA puis mise dans 100  $\mu$ l du tampon de chargement contenant du dodécyl sulphate de sodium (SDS). Un aliquot de 20  $\mu$ l de protéines immunoprécipitées a été chauffé à 95°C pendant 3 minutes puis analysé par western blot comme décrit ci-dessous en utilisant un anticorps polyclonal anti-HNE (1 :1000; calbiochem) comme anticorps primaire.

## **6. Susceptibilité des complexes HNE/COLL II à la dégradation**

Afin d'évaluer la sensibilité du COLL II modifié par le HNE à la dégradation par la MMP-13, 20  $\mu\text{g}$  de COLL II bovin commercial (sigma) ont été incubés dans un milieu contenant 50 mM de Tris et 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  pendant 1 h en présence et en absence de concentrations croissantes de HNE (0 à 20  $\mu\text{M}$ ). Ensuite, les échantillons ont été soumis à une deuxième incubation pendant 3 heures à 37°C en présence ou en absence de 0.2  $\mu\text{g}$  de MMP-13 activée par l'AMPA / test comme décrit par Reboul et al. (1996). Après incubation, les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel discontinu de polyacrylamine 4-8% (SDS-PAGE). Les gels ont été incubés dans une solution de bleu de coomassie (0.05 % coomassie brillant blue R250, 40 % méthanol, 7% acide acétique; Amersham Biosciences) durant 1 h puis lavés plusieurs fois dans une solution décolorante, contenant 40% de méthanol et 7% d'acide acétique, jusqu'à ce que les bandes soient visibles. Ils sont ensuite séchés et plastifiés. Afin de mesurer le pourcentage de COL II dégradé, les gels ont été scannés à l'aide d'un Bio-Rad Gel Doc<sup>TM</sup> 2000 (Bio-Rad). Les résultats sont calculés en unités relatives des bandes  $\text{TC}^A$  &  $\alpha 1$  et le pourcentage de dégradation du COL II est évalué par la mesure du rapport :  $(\text{TC}^A) / (\text{TC}^A + \alpha 1)$  (Mitchell et al. 1996).

## 7. Détection de protéines par Western Blotting.

Des chondrocytes de premier passage ont été traités pendant 48 h en présence ou en absence de concentrations croissantes de HNE (0 à 20  $\mu\text{M}$ ), de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ), de SIN (100  $\mu\text{M}$ ) et de  $\text{TNF}\alpha$  10 (ng/ml) pendant différentes durées d'incubation (de 0 à 120 minutes ou 48 h). 20  $\mu\text{g}$  de protéines totales



provenant d'extraits de chondrocytes lysées dans un milieu de RIPA sont récupérés et dilués dans un tampon d'électrophorèse (8% SDS, 24% glycérol, 100 mM de Tris à pH 6.8, 4% de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.02% de bleu de bromophénol). Ensuite, les protéines ont été séparées sur un gel discontinu de polyacrylamide de 4-12% en présence de 0.1% de SDS. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en utilisant un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 20% de méthanol comme décrit par Towbin et al. (1979). L'efficacité du transfert est contrôlée par une brève coloration de la membrane avec une solution de 5% d'acide acétique contenant 0.1% (p/v) de rouge Ponceau S (Sigma Chemical Co.)

Les membranes ont été ensuite rincées plusieurs fois après le transfert avec une solution de TTBS (20 mM de Tris à pH 7.5, 150 mM de NaCl et 0.1 % de Tween 20), puis saturées durant la nuit à 4°C sous agitation dans du tampon TTBS contenant 5% de lait écrémé.

Par la suite, les membranes ont été incubées à température ambiante sous agitation constante en présence des anticorps dilués dans du TTBS avec 5% de lait écrémé. Les anticorps utilisés sont: un anticorps polyclonal de lapin anti-HNE (1 :100; Cayman) et un anticorps polyclonal de lapin anti-COLL II humain (1 :500; calbiochem). Le niveau de phosphorylation a été détecté pour les MAPKs telles que p38, p54/46 et p44/42 en utilisant le kit

PhosphoPlus spécifiques (New England Biolabs, Mississauga, Ontario, Canada).

Les membranes sont alors lavées trois fois avec le TTBS et incubées pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec le deuxième anticorps (anti-lapin IgG – HRP, 1 :10,000 Jackson ImmunoResearch).

Après plusieurs lavages avec le TTBS, les membranes sont mises en contact avec un mélange équivolume de deux solutions commerciales du kit « supersignal blotting substrate » (Pierce) selon les instructions du fabricant. Les membranes sont exposées à des films Kodak X-AR5 (Eastman Kodak) et les autoradiographies scannées à l'aide du Bio-Rad Gel Doc<sup>TM</sup> 2000 (Bio-Rad). Les résultats sont donnés en unités relatives et sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

## **8. RT-PCR (Transcription inverse et polymérase en chaîne).**

L'ARN total a été extrait de chondrocytes isolés en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen Life Technologies) selon les instructions du fabricant. L'intégrité et la quantité d'ARN isolés ont été évaluées respectivement par électrophorèse sur gels d'agarose et par la mesure du ratio  $A_{260} / A_{280}$ . Des essais de RT-PCR ont été réalisés par l'utilisation d'un programmeur de température Thermocycler (Waterman, Biometra GmbH, Germany) avec un kit RT-PCR provenant d'Invitrogen life technology (Burlington). L'ADNc synthétisé a été amplifié à 95°C durant 1 minute puis à

60°C durant 30 minutes et enfin à 72°C pour 1 minute suivi par une incubation finale de 5 minutes à 72°C. Le nombre de cycles pour l'amplification a été sélectionné d'après la linéarité des produits de PCR (résultats non présentés).

Les oligonucléotides spécifiques utilisés dans cette étude sont : la MMP-13 humaine 5'-GACTTCACGATGGCATTGCTG-3' (sense), 5'-GCATCAACCTGCTGAGGATGC-3' (anti-sense); la COL II humain 5'-TAACCACTGCTCCACTCTGG 3' (sense), 5'-AGTTTCAGGTCTCTGCAGGT-3' (anti-sense), et la GAPDH 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' (sense), 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTTCAG-3' (anti-sense) (Biosource international, Nivelles, Belgium). Les contrôles négatifs pour la RT-PCR ont été faits en parallèle (résultats non présentés).

Les produits de PCR (10 µl / 50 µl) ont été analysés et vérifiés par électrophorèse sur gels d'agarose de 2.2 % (p/v). Des mesures semi-quantitatives de ces produits ont été réalisées en mesurant la densité optique (en unités arbitraires) de chaque bande à l'aide d'un système numérique (Bio-Rad Gel Doc<sup>TM</sup> 2000). Les valeurs de chaque bande ont été normalisées par rapport à celles de la GAPDH. Les données sont exprimées en pourcentage par rapport au contrôle.

## 9. Détermination de la MMP-13 et du TIMP-1

Afin d'établir l'effet du HNE sur la synthèse de la MMP-13 et de la TIMP-1, des chondrocytes OA ont été incubés pendant 48 h comme décrit précédemment avec des concentrations croissantes de HNE (de 0 à 20  $\mu$ M). À la fin de l'incubation, le milieu de culture est récupéré et la concentration de la MMP-13 et du TIMP-1 est déterminée par des kits d'ELISA (R & D Systems). Pour la MMP-13, le test a permis de mesurer la forme pro et la forme active de cette enzyme. La sensibilité est de 7.7 pg/ml et 80 pg/ml pour la MMP-13 et la TIMP-1 respectivement. L'absorbance est mesurée comme décrit ci-dessus.

#### **10. Inhibition de la protéine kinase**

Pour définir la voie de signalisation impliquée dans la stimulation de la MMP-13 par le HNE, les chondrocytes ont été incubés pendant 60 minutes avec des inhibiteurs de différentes kinases comme le PD 98059 (50 $\mu$ M) (inhibiteur MAPK p44/42; Calbiochem), PDTC (100 $\mu$ M) (inhibiteur de NF- $\kappa$ B; Sigma) et SB 202190 (10 $\mu$ M) (inhibiteur de la p38 MAPK; Calbiochem) suivie par une deuxième incubation de 48 h en présence de 10  $\mu$ M de HNE. La concentration de la MMP-13 a été ensuite déterminée dans le milieu de culture comme décrit ci-dessus.

#### **11. Détermination de l'activité de la MMP-13**

La forme active de la MMP-13 a été quantifiée dans les milieux de culture de chondrocytes OA à l'aide d'un kit commercial de Fluorokine (R & D system) suivant les instructions du manufacturier. La sensibilité du kit est de

0.008 ng/ml. L'absorbance est mesurée par l'utilisation d'un spectrofluoromètre (Photon Technology International, Lawrencelli, NJ) à une longueur d'onde d'excitation de 320 nm et une longueur d'onde d'émission de 405 nm.

## **12. Activation de la MMP-13 *in vitro* par le HNE**

100 nM de la pro-MMP-13 recombinant (R & D Systems) ont été incubés à 37°C pendant 1 h dans 300 µl de milieu contenant 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 en présence de HNE à différents ratios molaires (MR) de 1 :1 à 1 :10<sup>3</sup> (proMMP-13 *versus* HNE). Le traitement à l'APMA a été utilisé comme contrôle positif comme décrit par Reboul et al. (1996). L'activité de la MMP-13 a été mesurée comme décrit ci-dessus. L'effet protéolytique du HNE et la formation des complexes HNE/MMP-13 ont été mesurés par western blotting en utilisant un anticorps anti-pro et anti-active MMP-13 (Cayman) et un anticorps anti-HNE comme décrit ci-dessus.

## **13. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard). La signification statistique des différences entre les valeurs moyennes est ensuite évaluée par le test de *t*-student non apparié. Les résultats sont statistiquement significatifs lorsque la valeur de  $p < 0.05$ .

## **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

**DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES**

52-A

Annexe III

1. Identification de l'étudiant

Morquette Barbara J.

2. Nom de l'unité académique

Département de Sciences biomédicales

**Faculté de médecine**

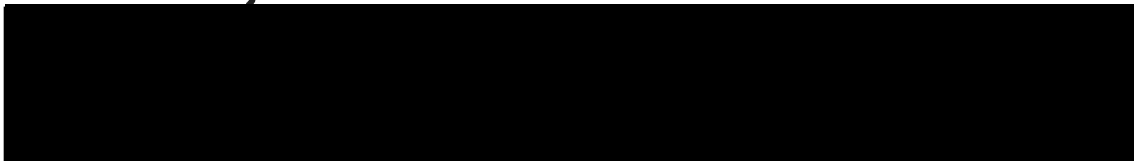
3. Nom du programme

**Programme Sciences biomédicales –**

4. Liste des articles proposés

Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: New evidence linking 4-hydroxynonenal to Cartilage degradation.

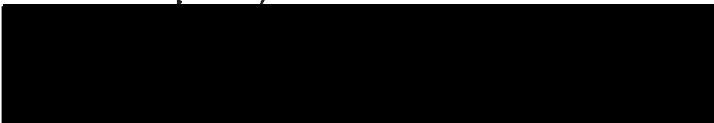
5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant les articles



6. Avis du directeur de recherche



*avis favorable*



7. Décision ou recommandation et signature du directeur du programme

\_\_\_\_\_  
Daniel Lajeunesse, Ph.D.

**SIGNATURE DES COAUTEURS****À faire parvenir par courrier à**

TGDE – Programme de Sciences  
biomédicales 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycles  
Faculté de médecine  
Pavillon Roger-Gaudry  
**Bureau P 710 M.Sc. P 709 Ph.D.**  
C.P. 6128, succursale Centre-ville  
Montréal, Qc  
H3C 3J7

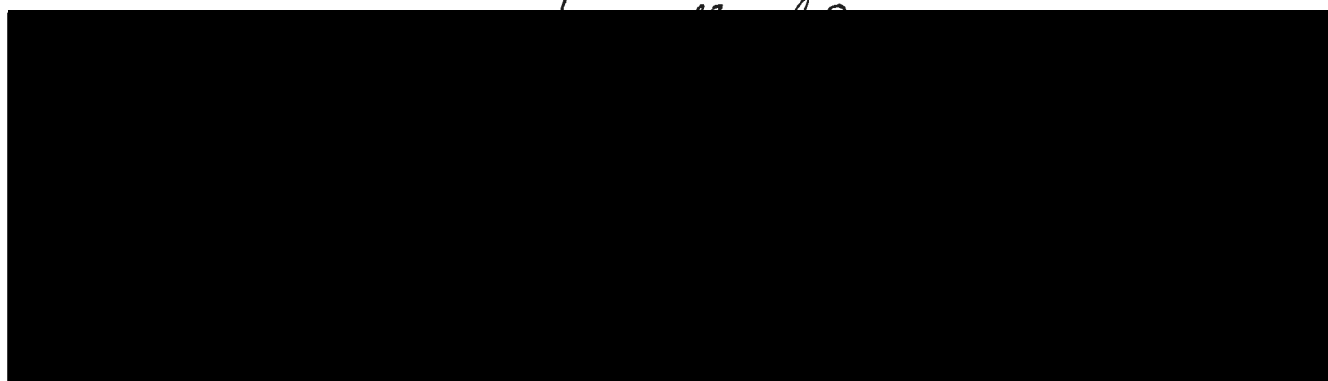
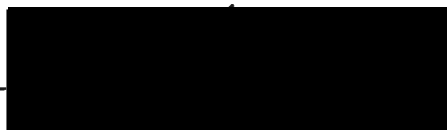
**ou par fax au 343-5751**

**Titre du 1<sup>er</sup> article :**

Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic  
tissues : New evidence linking 4-hydroxynonenal to  
cartilage degradation.

**Signature des coauteurs :**

Marquette Baubane  
Nom





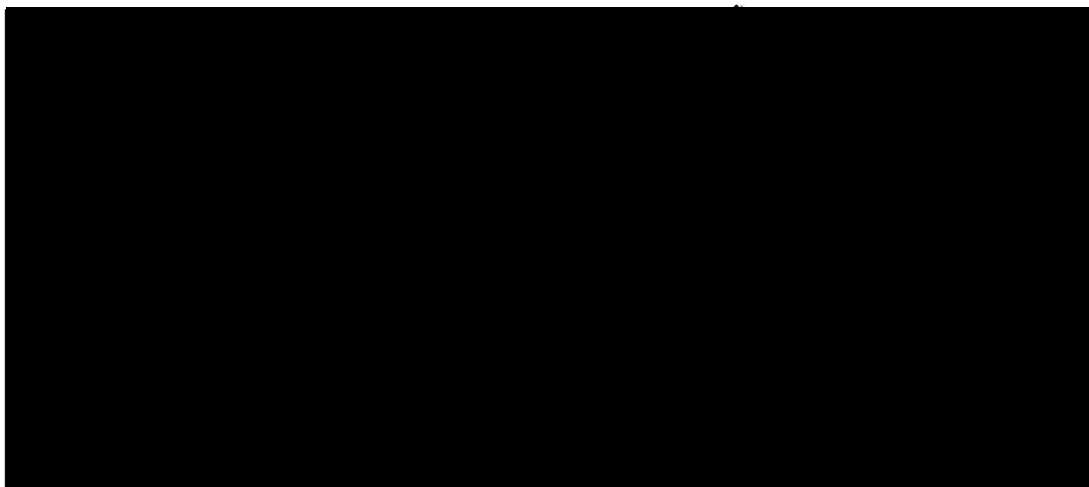
**SIGNATURE DES COAUTEURS****À faire parvenir par courrier à**

TGDE – Programme de Sciences  
biomédicales 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cycles  
Faculté de médecine  
Pavillon Roger-Gaudry,  
Bureau T-521  
C.P. 6128, succursale Centre-ville  
Montréal, Qc  
H3C 3J7

**ou par fax au 343-5751**

**Titre du 1<sup>er</sup> article :**

Production of ~~lipid~~ peroxidation products in  
Osteoarthritic tissues: New evidence linking  
4-hydroxynonenal to Cartilage degradation.

**Signature des coauteurs :**

**2. Please list grant support relevant to this study (note that this information must also be included in your manuscript)**

Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ, grant # 5330)  
Pfizer Canada (grant # NRA3190022).

**3. Study Activities**

In accordance with the requirement, in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, that authors should provide a description of what each contributed and editors may publish that information, please indicate which author(s) are responsible for the following aspects of the work. Note that each author should be named in at least one category.

	Name(s)
Study design	Morquette B, Benderdour M
Acquisition of data	Morquette B, Shi Q, Ranger P, Benderdour M
Analysis and interpretation of data	Morquette B, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M
Manuscript preparation	Morquette B, Lavigne P, Fernandes J.C, Benderdour M
Statistical analysis	Morquette B, Benderdour M

**4. Signature of Corresponding Author**

I certify that I have participated sufficiently in this work to take public responsibility for the work and to qualify as an author as defined in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://icmje.org/index.html#authorship>).

I hereby grant permission for any information I have disclosed on this form pertaining to my financial relationships, grant support, and participation in the study, or an appropriate summary, to be published with the manuscript in *Arthritis & Rheumatism* if the manuscript is accepted for publication.

I attest that each author of the manuscript has provided me with the information necessary in order for me to complete this form.

In the case of acceptance, I hereby transfer and assign all right, title, and interest, including copyright rights, in the work entitled, "Production of lipid peroxidation products in osteoarthritic tissues: New evidence linking 4-hydroxynonenal to cartilage degradation" the American College of Rheumatology. I warrant that the material is original, is not under consideration by another journal or other publication, has not been previously published elsewhere (in part or in full, in other words, or in the same words), and will not be submitted elsewhere unless rejected by *Arthritis & Rheumatism* (US Government employees please include an asterisk with signature and see asterisked statement below.)

Name (type or print) MOHAMED BENDERDOUR Sig 

## RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

**OBJECTIF :** Le but de cette étude était d'investiguer le rôle d'un produit de la peroxydation lipidique, le 4-hydroxynonenal (HNE), dans la dégradation du cartilage arthrosique (OA) via la modulation du collagène type II (COLL II) et la MMP-13. **MÉTHODES :** La concentration de HNE a été déterminée par ELISA dans le liquide synovial et dans des chondrocytes OA isolés, traités avec des donneurs de radicaux libres (RL). La formation des complexes HNE/COLL II a été mesurée dans des explants de cartilage par immunoprécipitation. L'expression du COLL II et de la MMP-13 au niveau protéique et ARNm a été investiguée par RT-PCR, western blotting et par des Kits commerciaux. De plus, nous avons évalué l'effet de la liaison du HNE sur le COLL II et la MMP-13. **RÉSULTATS :** Nos résultats montrent que le niveau des complexes HNE/protéine est plus élevé dans les liquides synoviaux OA comparativement aux sujets normaux et dans les chondrocytes OA traités avec des donneurs RL comparativement aux cellules non traitées. Dans les explants de cartilage, la dégradation du cartilage induit par le HNE a été mise en évidence par la génération de fragments de COLL II. Nous avons montré que la modification du COLL II par le HNE accélère sa dégradation par la MMP-13. La concentration des complexes HNE/COLL II augmente dans les explants de cartilages OA incubés avec des donneurs de RL. Nous avons aussi démontré que le HNE inhibe l'expression du COLL II et du TIMP-1 mais par contre induit l'expression de la MMP-13 l'activation de la p38 MAPK. *In vitro*, la MMP-13 a été identifiée comme une cible du HNE et est activé par ce dernier à un ratio molaire de  $1:10^2$  (MMP-13 vs HNE). **CONCLUSION:** Nous

suggérons dans cette étude un nouveau mécanisme liant le stress oxydatif à la dégradation du cartilage OA. Ce mécanisme met l'accent sur l'implication du HNE dans les modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles du COLL II et de la MMP-13 dans la pathophysiologie de l'OA.

**PRODUCTION OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS IN  
OSTEOARTHRITIC TISSUES: NEW EVIDENCE LINKING  
4-HYDROXYNONENAL TO CARTILAGE DEGRADATION**

Barbara Morquette, Qin Shi, Patrick Lavigne, Pierre Ranger, Julio C.  
Fernandes, and Mohamed Benderdour

Orthopaedic Research Laboratory, Sacré-Cœur Hospital, University of  
Montreal, Montreal, Quebec, Canada

**Running title:** Cartilage degradation and HNE in osteoarthritis

Address reprint requests and other correspondance to Dr Mohamed  
Benderdour, Laboratoire de recherche en Orthopédie, Hôpital du Sacré-Cœur  
porte K-3045, 5400 boul. Gouin Ouest, Montreal (Qc) Canada H4J 1C5;  
Telephone (514) 338-2222 (ext. 3279), Fax: (514) 338 2694. Email:

[REDACTED]

### **ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** The 4-hydroxynonenal (HNE), a lipid peroxidation product, is prominently produced in osteoarthritic (OA) synovial cells, but its specific contribution in cartilage destruction is not understood. This study was designed to test whether HNE signalling and binding are involved in OA cartilage degradation through type II collagen (COLL II) and matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) modulation. **METHODS:** HNE level was determined by Elisa in synovial fluids and in isolated OA chondrocytes treated with free radicals (FR) donors. The formation of the HNE/COLL II adducts was measured in cartilage explants by immunoprecipitation. Levels of COLL II and MMP-13 mRNA and protein were determined by RT-PCR, Western blotting and commercial kits. **RESULTS:** Our data showed that HNE/protein adducts levels were higher in OA synovial fluids compared to normal, and in OA chondrocytes treated with FR donors compared to untreated cells. In cartilage explants, HNE induces COLL II cleavage as established by neoepitopes generation. The level of HNE/COLL II adducts was increased in OA cartilage explants incubated with FR donors. Modification of COLL II by HNE accelerates its degradation by active MMP-13. In isolated OA chondrocytes, HNE inhibits COLL II and TIMP-1 expression and induces MMP-13 mainly through p38 MAPK activation. *In vitro*, HNE binding to MMP-13 activates this enzyme at a molar ratio of 1:100 (MMP-13 vs HNE). **CONCLUSION:** The increased level of HNE in OA cartilage and the ability of HNE to induce transcriptional and post-translational modifications of COLL II and MMP-13 suggest that this aldehyde could play a role in OA.

## **INTRODUCTION**

The deterioration and loss of articular cartilage leading to an irreversible impairment of joint motion are the final pathogenic events common to osteoarthritis (OA). This progressive condition develops in response to mechanical and environmental stimuli, and is orchestrated by growth factors and cytokines, which act through several signalling cascades (1-3).

Cartilage extracellular matrix (ECM) consists of two major components: a type II collagen (COLL II) and proteoglycan aggregates composed of a non covalent association between aggrecan, hyaluronate and link protein (4;5). In OA, proteoglycan degradation is thought to be an early and reversible process, whereas the breakdown of the collagen network is believed to be irreversible (6-8). To maintain a healthy collagen network, chondrocytes continuously remodel the ECM, albeit slowly (9;10). Changes in the capacity of chondrocytes to maintain collagen network are likely to affect the integrity of the cartilage matrix and thereby influence the resistance to cartilage degeneration. Specifically, chondrocytes secrete large amount of matrix metalloproteinases-13 (MMP-13), an enzyme that preferentially cleaves COLL II (11;12). In OA chondrocytes, regulation of MMP-13 expression involves various cytokines including interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-17, and tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (11;13).

Oxidative stress plays a crucial role in maintaining and sustaining cartilage degradation. In articular chondrocytes, evidence has been provided that reactive oxygen species (ROS) were involved as signalling intermediates

for  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{IL-1}\beta$  (14;15). It has been suggested that ROS produced inside the joint may contribute significantly to the pathogenesis of OA, since these inorganic oxidants are able to degrade cartilage via oxidation of ECM components or post-translational modification (PTM) of MMPs (16;17). PTM of these enzymes by ROS results in their activation by the "cysteine-switch" mechanism with or without further proteolysis (17;18). Furthermore, ROS may shift the balance of proteolytic potential by decreasing the production and/or the activity of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (19).

ROS-induced lipid peroxidation (LPO) of membrane polyunsaturated fatty acids results in aldehydes production. Similar to ROS, aldehydes are electrophiles that bind to the nucleophilic groups of proteins, but their relatively longer half-life make them candidates for the propagation of damage to neighboring cells (20;21). Under intense oxidative stress, the level of aldehydes becomes very significant and this increase is believed to contribute to the development of many pathological conditions (21). Of specific interest to this study is 4-hydroxynonenal (HNE), the principal  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde formed from LPO of both  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids, whose formation is enhanced in synoviocytes from OA patients (22). Within cells, most HNE is generated through uncontrolled non-enzymatic reactions during LPO, and its homeostasis seems to be regulated primarily by its metabolism. Whether HNE is a "second toxic messenger", as first hypothesized by Esterbauer and coll. (23), or merely represents changed marker of extensive tissue damage, has long been a subject of controversy. This situation changed recently, when HNE was found to be a normal



constituent of mammalian tissue membranes. In addition, growing evidence supports a role for HNE as a (patho)physiological modulator of signal transduction and PTM (21;24-26). The electrophilic nature of HNE makes it highly reactive with specific amino acid of proteins via Michael-type addition: the sulfhydryl group of cysteine (CYS) or lipoic acid, the  $\epsilon$ -amino group of lysine, or the imidazol function of histidine (23). These chemically modified proteins undergo various changes in their function (26).

To gain additional insight into the potential role of aldehydes in cartilage catabolism, we tested the hypothesis that HNE affects COLL II turnover and MMP-13 expression. Accordingly, two major data were obtained in this study. At post-translational level, our results showed that HNE binding accelerates COLL II degradation and activates MMP-13, possibly via PTM. At protein and mRNA levels, we report that HNE inhibits COLL II expression but, in contrast, induces MMP-13. By these mechanisms, the contribution of HNE in the impaired cartilage COLL II turnover may help to elucidate the etiology of OA.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Specimen selection.** Synovial fluids and cartilage specimens were obtained from normal subjects at autopsy ( $59 \pm 11$  years, mean  $\pm$  SE) and patients with OA ( $65 \pm 7$  years, mean  $\pm$  SE) who underwent total knee joint replacements ( $n=28$ ). Diagnosis was established according to the American College of Rheumatology criteria (27). OA cartilage (femoral condyles and tibial

plateaus) was obtained under aseptic conditions and carefully dissected from the underlying bone in each specimen.

**Culture conditions.** Cartilage specimens were rinsed, diced and cells released as previously described (13). Cartilage pieces were digested at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) with 1 mg/ml of pronase (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) for 1 hour, followed by 2 mg/ml of type IV collagenase (Sigma) for 6 hours supplemented with 10 % heat inactivated foetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) and 100 U/ml penicillin / 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL). After cartilage digestion, isolated chondrocytes were seeded at high density in culture flasks until confluence in 10% FBS/DMEM at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/ 95% air. First passage chondrocytes were seeded at 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> in tissue culture plates as described above. 24 hours prior to experiment, the medium was replaced by a fresh medium containing 1% FBS and experiments performed in this medium supplemented with the factors under study.

**Tissue levels of HNE/protein adducts.** Total tissue levels of HNE/protein adducts were assessed in synovial fluids and cellular extracts of chondrocytes incubated for 48 h with increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3-morpholiniosydnonimine (SIN), or TNFα using a house enzyme-linked immunoabsorbent assay (Elisa) as described previously (26).

**Determination of COLL II cleavage.** Experiments were conducted with OA cartilage explants in the presence or absence of increasing concentrations of HNE (0 to 100  $\mu$ M) for 5 days. Then, the culture medium was collected and cartilage explants homogenized in extraction buffer 50 mM Tris HCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05% Brij 35, 2 M guanidine hydrochloride, pH 7.5 as described by Roy-Beaudry and coll. (28). After centrifugation, extracts were dialyzed extensively against 50 mM Tris HCl, pH 7.5 and then collected for assays. The C-2-C assay was used to measure COLL II cleavage (IBEX, Montreal, Qc).

**Immunoprecipitation.** For the detection of HNE/COLL II adducts, OA cartilage explants (~150 mg) were incubated for 5 days in 1%FBS/DMEM with or without 100  $\mu$ M  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 500  $\mu$ M SIN, 10 ng  $\text{TNF}\alpha$ , or 20  $\mu$ M HNE as positive control. Then, explants were homogenized on ice in 1 ml of RIPA buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100), supplemented with protease inhibitors, 2 M guanidine hydrochloride and the extracts dialyzed overnight against RIPA buffer at 4°C. 200  $\mu$ g of tissue protein were pre-incubated with protein G resin (Sigma) at 4°C, and then subjected to immunoprecipitation with rabbit anti-human COLL II antibody (1:500; Calbiochem) in RIPA buffer (26). After overnight incubation, protein G resin was added and the mixture incubated for 2 h and centrifuged. The resin was washed with RIPA buffer and proteins were removed from the resin by the addition of 100  $\mu$ l undiluted sodium dodecyl sulfate (SDS)-loading buffer.

The immunoprecipitates were analyzed by western blot using rabbit anti-HNE antibody (1:1000; Calbiochem) as primary antibody.

**COLL II digestion assay.** To evaluate the susceptibility of HNE-modified COLL II to degradation by MMP-13, 20  $\mu$ g of COLL II from bovine cartilage (Sigma) was incubated in a buffer containing 50 mM Tris, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , for 1 h with or without increasing concentration of HNE (0 to 20  $\mu$ M). Samples were then incubated for 3 h at 37°C in the presence or absence of APMA-activated MMP-13 (0.2  $\mu$ g/assay) as described by Reboul and coll. (11). After incubation, samples were subjected to discontinuous 4-8% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after which the protein bands were stained in 0.5% Coomassie blue. Then, gels were scanned using Bio-Rad Gel Doc<sup>TM</sup> 2000 (Bio-Rad) and protein levels corresponding to  $\text{TC}^A$  and  $\alpha 1$  bands are quantified by densitometric analysis and expressed in relative units. Collagen degraded (%) =  $(\text{TC}^A)/(\text{TC}^A + \alpha 1)$  (11).

**Protein detection by western blotting.** 20  $\mu$ g of total proteins from chondrocyte lysates treated with different factors were subjected to discontinuous 4-12% SDS-PAGE and transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were immersed overnight at 4°C in blocking buffer (Pierce) and incubated again in blocking buffer containing rabbit anti-HNE (Cayman) or rabbit anti-human COLL II (Calbiochem). Levels of phosphorylation were detected for the p38, p54/46, and p44/42 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) using specific

PhosphoPlus kits (New England Biolabs). Then, membranes were washed with Tween-Tris-buffered saline (TTBS: 0.05% Tween, 20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5), and incubated for 1 h with goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate (Jackson Immuno Research). Immunoreactive proteins were visualized with Supersignal blotting substrate (Pierce). The membranes were exposed to Kodak X-AR5 film (Eastman Kodak) and the autoradiographs were scanned with the Bio-Rad Gel Doc<sup>TM</sup> 2000.

**Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).** Total RNAs were extracted from isolated chondrocytes with TRIzol (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's specifications. RT-PCR assays were carried out using SuperScript RT-PCR kit manufactured by Invitrogen life technology (Burlington). 1 µg of total RNAs was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) by incubation at 42°C for 30 min. The synthesized cDNAs were amplified for 25 cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 30 sec, and 72°C for 1 min with a final incubation at 72°C for 5 min. Each reaction contained 100 ng of the following sense and anti sense specific primers: human MMP-13 sense 5'-GACTTCACGATGGCATTGCTG-3' and antisense 5'-GCATCAACCTGCTGAGGATGC-3', human COLL II sense 5'-TAACCACTGCTCCACTCTGG-3' and antisense 5'-AGTTTCAGGTCTCTGC AGGT-3', human GAPDH sense 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' and antisense 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTTCAG-3' (Biosource international). Negative controls for RT-PCR were also run in parallel (data not shown).

PCR products were separated on 2.2% agarose gel and scanned. cDNA values for MMP-13 and COLL II were normalized to that of GAPDH.

**Determination of MMP-13 and TIMP-1.** For the HNE dose-response curves, chondrocytes were incubated 48 h as described above with increasing concentrations of HNE (0 to 20  $\mu$ M). Following incubation, the culture medium was collected and the MMP-13 and TIMP-1 levels were determined using specific Elisa kits (R&D system). For MMP-13, the assay permits the measurement of both pro- and active MMP-13.

**Protein kinase inhibition:** To define the pathways involved in activating HNE-induced MMP-13 production, chondrocytes were pre-incubated for 60 min with PD 98059 (50  $\mu$ M) (p44/42 MAPK inhibitor; Calbiochem), PDTC (100  $\mu$ M) (NF- $\kappa$ B inhibitor; Sigma), and SB 202190 (10  $\mu$ M) (p38 MAPK inhibitor; Calbiochem) followed by the addition of 10  $\mu$ M HNE for 48 hours. Following incubation, MMP-13 levels were determined in the culture medium as described above.

**MMP-13 activity:** The active form of MMP-13 was quantified in conditioned OA chondrocytes media using a Fluorokine Enzyme Kit (R & D systems) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the kit is 8 pg/ml. The absorbance was measured using spectrofluorometer (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ) at an excitation wavelength of 320 nm and an emission wavelength of 405 nm.

**MMP-13 activation *in vitro*:** 100 nM of recombinant proMMP-13 (R & D systems) was incubated at 37°C for 1 h in 300 µl of a buffer containing 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 with HNE at different molar ratios (MR) from 1:1 to 1:10<sup>3</sup> (proMMP-13 vs HNE). APMA treatment was used as positive control. MMP-13 activity was assayed as described above. The proteolytic effect of HNE and HNE/MMP-13 adducts formation were evaluated by western blotting using antibodies anti-pro and active MMP-13 or anti-HNE as described above.

**Statistical analysis:** The data are expressed as the means ± SE. Statistical significance was assessed by Student's unpaired *t* test and *P* values less than 0.05 were considered significant.

## **RESULTS**

**HNE/protein adducts levels.** This part of the experiment was designed to verify the presence of HNE/protein adducts in synovial fluid of OA patients compared to healthy individuals and is reported in Figure 1A. HNE/protein adducts levels were 1.6 fold higher in OA synovial fluids compared to that of normal ( $p \leq 0.01$ ).

To confirm that modification of proteins by HNE is an oxidative stress-dependent process, HNE/protein adducts levels were quantified in cellular extracts of OA chondrocytes incubated with increasing levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SIN and TNF $\alpha$ . Data show that all these factors induce the formation of HNE/protein adducts in OA chondrocytes (Figures 1B & 1C). The

corresponding HNE/protein adducts profile generated following incubation of OA chondrocytes with these mediators is reported in Figure 1D. As shown in this Figure, the intensity of immunoreactive bands increases in the presence of 20  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M SIN, 10 ng/ml TNF $\alpha$  or 10  $\mu$ M HNE and mostly had a molecular weight superior to 60 kDa (MW  $\geq$  60 kDa).

**HNE-induced COLL II cleavage.** COLL II is the major component of ECM in articular cartilage. To assess the action of HNE on COLL II turnover, we have evaluated cartilage degradation by measuring MMPs-generating COLL II epitopes using a specific commercial kit that measured C-2-C epitopes of COLL II. As illustrated in Figure 2A, exposure of cartilage explants to HNE increased cleaved COLL II fragments in cartilage extracts in a dose-dependent manner. COLL II fragments reached significance at 20  $\mu$ M of HNE. However, the level of cleaved COLL II fragments was not changed in the culture medium in the presence of HNE (data not shown).

To test the consequences of COLL II modification by HNE, *in vitro* experiments were performed to evaluate the susceptibility of HNE/COLL II adducts to degradation by active MMP-13. 20  $\mu$ g of commercial COLL II was incubated in the presence or absence of increasing concentrations of HNE (0 to 20  $\mu$ M) followed by a second incubation with buffer (control) or 0.2  $\mu$ g/assay activated MMP-13 for 3 h. After Coomassie blue coloration, gel analysis revealed that HNE accelerates COLL II degradation by activated MMP-13 whereas the presence of HNE alone does not affect significantly COLL II (Figure 2B). With the presence of 20  $\mu$ M of HNE, the enzyme



digested 95% of COLL II compared to native COLL II (60% of degradation), while in untreated samples with MMP-13, HNE induced a faint spontaneous degradation of COLL II.

To confirm the formation of HNE/COLL II adducts, OA cartilage explants were incubated for 5 days with FR donors ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , SIN),  $\text{TNF}\alpha$ , or HNE (positive control). After protein extraction, cartilage extracts were immunoprecipitated with rabbit anti-human COLL II antibody and then subjected to western blotting. Using anti-HNE, our results revealed a signal corresponding to HNE/COLL II conjugates, whose intensity was increased in the presence of 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  SIN, 10 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ , or 20  $\mu\text{M}$  HNE (Figure 2C). Extracts from untreated OA cartilage revealed a very low signal.

**COLL II inhibition by HNE.** To evaluate the effect of HNE on COLL II expression in OA chondrocytes, cells were incubated with increasing concentrations of HNE for 48 h. As shown in Figures 3A & 3B, HNE inhibits COLL II at protein and mRNA levels in a dose-dependent manner. This effect reaches significance at concentration  $\geq 5\mu\text{M}$ . However, HNE had no effect on other collagens such as type I collagen as shown by western blotting (data not shown).

**MMP-13 and TIMP-1 regulation by HNE.** In cartilage, MMP-13 is the most important enzyme implicated in COLL II degradation during the OA process. To assess the role of HNE in the induction of this enzyme, we evaluated its activity and expression in OA chondrocytes. Figure 4 reports MMP-13 activity

(Figure 4A), protein level (Figure 4B), and mRNA expression (Figure 4C) following HNE exposition. After 48 h of incubation, HNE significantly induced MMP-13 activity and protein synthesis in a dose-dependent manner (Figures 4A & 4B). Similarly, RT-PCR for MMP-13 shows the generation of 450 pb bands in the basal and stimulated conditions. In the presence of 10  $\mu$ M of HNE, the level increased 2.5-fold compared to untreated cells (Figure 4C).

*In vivo*, because MMP-13 activity is controlled by TIMP-1 level, we further studied the effect of HNE on TIMP-1 synthesis in OA chondrocytes. Compared to the control, 10  $\mu$ M HNE reduced 20% of the TIMP-1 protein level in the culture medium (Figure 4D).

**p38 MAPK mediates HNE-induced MMP-13.** To gain insight into the signalling pathway activated by HNE in human OA chondrocytes, we first examined the HNE-induced phosphorylation patterns of MAPKs over increasing periods of time. Our data indicate that p38 MAPK was rapidly and strongly phosphorylated within minutes of stimulation. Activation peaked at ~ 30 min of incubation and declined slightly at ~ 120 min (Figure 5A). However, our results showed that HNE is a weak activator of p44/42 and p54/46 MAPK, as only slight phosphorylation of these MAPKs was observed after 30 min of stimulation. In order to better define the HNE signalling cascades involved in MMP-13 synthesis, OA chondrocytes were preincubated with chemical inhibitors of p38 MAPK (SB202190), p44/42 (PD98059) and NF- $\kappa$ B (PDTC) before adding 10  $\mu$ M HNE. As seen in Figure 5B, only treatment with SB202190 significantly reduced HNE-induced MMP-13 synthesis.

**MMP-13 as a potential target of HNE.** HNE is an endogenous aldehyde that binds to several enzymes and modulates their activities. In an attempt to explain the increase in MMP-13 activity observed in treated OA chondrocytes with HNE, we tested the hypothesis of potential MMP-13 activation by HNE binding to this enzyme. Figure 6A shows that proMMP-13 is activated by HNE, depending on the MR (proMMP-13 vs HNE). The enzyme was activated by HNE at MR of  $1:10^2$  but inactivated at  $MR \geq 1:10^3$ . As positive control, APMA treatment resulted in strong activation of MMP-13.

Furthermore, the proteolytic activity of HNE-activated proMMP-13 was assessed using an antibody that binds to pro and active forms of MMP-13. Analysis of HNE-activated proMMP-13 by western blotting identified only one band corresponding to proMMP13 (molecular weight  $\sim 60$  kDa) (Figure 6B). For the sake of comparison, the activation of proMMP-13 by APMA (positive control) generated a second band of  $\sim 46$  kDa. To confirm the formation of HNE/MMP-13 adducts, we performed western blotting of recombinant MMP-13 incubated with HNE as indicated above. Using anti-HNE antibody, protein complexes corresponding to HNE/MMP-13 conjugates were revealed, whose intensity was proportional to HNE concentration (Figure 6B). Samples from untreated enzymes did not show any signal.

## **DISCUSSION**

The present study evaluated the presence of HNE, an LPO-end product, in OA synovial fluids and chondrocytes, and its catabolic effects in articular tissues. We found that HNE/protein adducts were increased in OA patients compared to normal individuals. With the ultimate goal of clarifying the catabolic role of HNE in OA, we documented its ability to affect COL II and MMP-13 at transcriptional and post-translational levels.

We have documented a significant increase in the level of endogenous HNE in its adducted form from OA synovial fluids compared to control subjects. These data are in concordance with that of Grigolo and coll. (22) who reported higher levels of both malondialdehyde (MDA) and HNE in OA human synoviocytes compared to normal cells (22). Secondly, isolated OA chondrocytes incubated with  $\text{TNF}\alpha$  or FR donors provided direct evidence for the implication of these mediators in HNE production, given that all these factors were able to increase HNE/protein adducts levels in cellular extracts. Previous studies have demonstrated that cytokines such as  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{TNF}\alpha$  are able to induce the LPO process in several types of cells (29;30). Laskey and coll. have also reported the ability of SIN to induce this process by peroxynitrite generation (31). By Western blotting, the analysis of HNE-modified proteins indicated that their molecular weight is situated at  $\geq 60$  kDa. We speculate that the modification of proteins ( $\text{MW} \geq 60$  kDa) by HNE could have an impact on protein structure and function.

Several lines of evidence indicate increased ROS production in OA tissues in response to mechanical stresses or inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$  or TNF $\alpha$  (15;32). The accumulation of ROS-related products in synovial fluids and cartilage has been observed in experimental and clinical models of arthritis, suggesting the implication of ROS in the disease (33;34) but factors promoting increased accumulation of HNE/protein adducts in OA remain to be clarified. These include the antioxidants enzymes inactivation, NADPH redox status and glutathione (GSH) regeneration. Another factor ought to be considered in addition to an increased production of ROS is the intrinsic capacity of the cells to metabolize HNE, free or bound, to non-toxic products. This can occur through (i) reduction to 1,4-dihydroxynonenol by aldose reductase (35), (ii) oxidation to 1,4-dihydroxynonenoic acid by aldehyde dehydrogenase followed by its rapid removal by the fatty acid carrier (35), (iii) conjugation with GSH by the glutathione-S-transferase (GST) followed by export (35). There is no literature data about the activity and expression of these enzymes in OA. In patients with rheumatoid arthritis, Mathey and co-workers demonstrated that disease severity is related to a null polymorphism at the GST M1 locus (36;37). In OA, additional work is needed to evaluate the link between the capacity of HNE metabolizing enzymes, HNE/protein adducts accumulation, and in turn OA development.

To clarify the role of HNE in OA, we investigated its effect on COLL II synthesis and degradation. In isolated OA chondrocytes, our data showed that HNE inhibits COLL II synthesis at protein and mRNA levels. In contrast to COLL I, the transcriptional regulation of COLL II by LPO-end products has not

been clarified yet. Garcia-Ruiz and coll. (38) have suggested that MDA stimulated COLL I gene expression by inducing the synthesis of Sp1 and Sp3 and their binding to the promoter region. Interestingly, these transcription factors mediate IL-1 $\beta$  -down regulation of COLL II in articular rabbit chondrocytes (39). Thus, it is tempting to speculate that the reduction of COLL II by HNE in OA chondrocytes results from the activation of Sp1 and Sp3 transcription factors. Using OA cartilage explants, we showed that HNE increases COLL II degradation as measured by COLL II fragments and hydroxyproline release (data not shown). The observation that HNE induce COLL II degradation could be attributed to its direct action via its binding or to indirect action via MMPs modulation. All data suggest that HNE decrease COLL II content in cartilage under two distinct pathways: (i) inhibition of COLL II synthesis and deposition by chondrocytes and/or (ii) COLL II breakdown.

One major finding of this study was the direct immunological evidence for the *ex vivo* HNE/COLL II adducts in OA cartilage. The HNE/COLL II adducts levels increased in response to TNF $\alpha$ , SIN or HNE within the tissue. The formation of adducts was faintly observed in untreated cartilage. These data provide a biochemical clue to a structural change of COLL II in OA cartilage. It suggests that, under oxidative stress, COLL II will be a target for HNE binding. Our results, showing an increased accumulation of HNE/COLL II adducts in OA cartilage, concur with other reports indicating that the incubation of chondrocytes with calcium ionophore results in the accumulation of protein oxidation and, in turn, to matrix degradation (40). Additionally, it has been identified that COLL II was a potential target to MDA

binding (41). Furthermore, we have investigated the vulnerability of HNE-modified COLL II to the degradation. Our results clearly show that HNE/COLL II adducts were digested rapidly by this enzyme compared to native COLL II. In a similar process, previous studies have indicated that ROS mediate cartilage degradation via oxidative damage of cartilage components (42). Our data are therefore consistent with the evidence that oxidatively modified proteins are highly sensitive to proteolytic breakdown (43;44). The *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated a clear link between oxidative protein modifications and protein turnover (45). The alteration of protein turnover by ROS exposure was attributed to alteration in primary, secondary, and tertiary structures of protein (46). The fact that HNE increased the proteolytic susceptibility of COLL II suggests the presence of changes of the protein structure. The triple helical structure of collagens is normally resistant to enzymatic digestion (47). However, once the collagens are oxidatively modified, the fibrils become highly susceptible to proteolytic degradation (48;49).

It is commonly believed that MMP-13 is considered the most important MMPs involved in cartilage degradation. To date, numerous cytokines and factors are known to up-regulate the production of the MMP-13. In this study, we clearly showed that HNE increases MMP-13 activity, protein synthesis, and mRNA levels. This effect occurs at the transcriptional level and requires the activation of p38 MAPK but not p54/46 and p44/42 MAPK, in contrast to cytokines signalling pathways involved in MMP-13 synthesis (50;51). The HNE signalling pathways are not, however, limited to activating p38MAPK.

Previous studies reported that HNE activates p54/46 and p44/42 MAPK (52). Downstream, we demonstrated that HNE-induced MMP-13 production is associated with increased AP-1 binding and c-jun phosphorylation (data not shown). The AP-1 transcription factor plays an essential role in the transactivation of MMP-13 in response to cytokines (13).

To determine whether modification of MMP-13 by HNE resulted in its activation, we conducted additional experiments *in vitro* by incubation of recombinant proMMP-13 with increasing concentrations of aldehyde. We report for the first time that HNE activates MMP-13 at MR  $\sim 1:10^2$  (MMP-13 vs HNE). By the use of anti-pro and active MMP-13, western blot analysis revealed the presence of only one specific band of 60 kDa, suggesting that the activation of MMP-13 by HNE could occur by conformational change without proteolytic cleavage of its prodomain. All these modifications are consistent with previous studies reported by Bescond and co-workers (53) showing the activation of proMMP-2 by homocysteine without proteolytic cleavage. MMP-13 is activated by the exposure of  $\text{Zn}^{2+}$  in the active site following disruption of the  $\text{Zn}^{2+}$ -CYS interaction, a mechanism known as the CYS switch (54). Cellular mechanisms responsible for MMP-13 activation have been proposed by which MMP-14 and MMP-2 would act by forming a proteolytic activation cascade to process the proMMP-13 to the fully active enzyme (55). In addition, a second mechanism of MMPs activation was proposed that includes direct interaction of ROS and NO with CYS under oxidative stress conditions (17;56). Knowing the chemical reactivity of HNE to CYS residue and the available structure information of MMP-13, we



attempt to speculate that HNE at low concentrations activates MMP-13 by disrupting the  $\text{Zn}^{2+}$ -CYS interaction. However, at high level, the inactivation of MMP-13 by HNE binding could be attributed to its reactivity with histidine residue at active site. At neutral pH, HNE reacts preferentially with cysteine and lysine residues compared to histidine. According to these data, we suggest that HNE regulates MMP-13 activity by cysteine and lysine modification followed by histidine modification. This mechanism remains to be demonstrated.

In conclusion, our data demonstrate new evidence for the catabolic role of HNE, an oxidative stress-related product, in the pathophysiology of OA. We suggest that the accumulation of HNE/protein adducts in articular tissues may be a relevant marker of oxidative stress-related events linked to OA development. Modification of cartilage COLL II by HNE increases its vulnerability to degradation by MMP-13. Moreover, the latter was shown to be activated by HNE binding. To the best of our knowledge, MMP-13 has not yet been considered to be an HNE target. In addition, HNE has the ability to down-regulate COLL II and TIMP-1 synthesis with a concomitant up-regulation of MMP-13 activity and expression. Provided that HNE binding to MMP-13 results in its activation, it could potentially be reversed by an HNE-sequestering drug treatment (57). However, to predict the potential impact of such therapeutic strategy on OA development, additional work is needed to clarify whether an increase in HNE/COLL II and/or HNE/MMP-13 adducts is part of the catabolic events that can contribute to cartilage degradation.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the Fonds de la recherche en santé du Québec (grant #5330) and by Pfizer Canada. Part of this work was published as an abstract at the 9<sup>th</sup> World Congress of the Osteoarthritis Research Society international.

### **LEGENDS**

**Figure 1. Quantification and characterization of HNE/protein adducts by Elisa and western blotting.** (A) HNE/protein adducts in synovial fluids from normal subjects (n=5) or patients with OA (n=18) and (B & C) in cellular extracts of chondrocytes treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SIN, or TNF $\alpha$  (n=3) were measured by Elisa. (D) Characterization of HNE/protein adducts profile by western blotting using polyclonal anti-HNE. Cellular extracts of chondrocytes were recovered from (B & C). Data are means  $\pm$  S.E. of indicated n values. Statistics: Student's unpaired t test; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

**Figure 2. HNE induces COLL II degradation and modification.** (A) OA cartilage explants were incubated with increasing concentrations of HNE for 5 days. COLL II degradation was evaluated by the quantification of C-2-C epitopes of COLL II in cartilage explants. (B) 20  $\mu$ g of commercial COLL II was incubated with increasing concentrations of HNE and then digested with active MMP-13 for 3 h followed by SDS-PAGE. The % COLL II degradation was assessed as described in materials and methods. (C) OA cartilage explants were incubated with or without 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M SIN, 10 ng/ml TNF $\alpha$ , or 20  $\mu$ M HNE for 5 days and cartilage extracts were subjected to immunoprecipitation and western blotting using anti-HNE antibody. Data are means  $\pm$  S.E. of n=3. Statistics: Student's unpaired t test; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

**Figure 3. Dose-dependent effect of HNE on COLL II expression.** OA chondrocytes were incubated with increasing concentrations of HNE for 48 h. Total proteins (A) and RNA (B) were extracted from treated OA chondrocytes and proceeded as described in material and methods. Quantification of protein and mRNA levels (arbitrary units) was achieved by densitometry analysis. mRNA levels were normalized to those of GAPDH mRNA and expressed as a percentage of untreated cells. Data are means  $\pm$  S.E. of  $n=3$ . Statistics: Student's unpaired t test; \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

**Figure 4. Dose-dependent effect of HNE on MMP-13 and TIMP-1 expression.** OA chondrocytes were incubated with increasing concentrations of HNE for 48 h. Enzymatic activity (A) and protein levels (B) were measured in culture medium by specific kits. MMP-13 mRNA levels (C) were determined by semi-quantitative RT-PCR. Quantification of mRNA levels (arbitrary units) was achieved by densitometry analysis. mRNA levels were normalized to those of GAPDH mRNA and expressed as a percentage of untreated cells. (D) OA chondrocytes were incubated for 48 h in the presence or absence of 10 or 20  $\mu$ M of HNE and TIMP-1 level was assayed in the conditioned media. Data are means  $\pm$  S.E. of  $n=12$ . Statistics: Student's unpaired t test; \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

**Figure 5. Kinetics of HNE-dependent activation of proteins kinase and effect of their inhibitors on HNE-induced MMP-13 production.** (A) OA chondrocytes were incubated with 10  $\mu$ M HNE for increasing periods of

incubation. Cellular extracts were then subjected to western blotting using the specific antibodies. (B) OA chondrocytes were pre-incubated for 1 h with MAPK inhibitors followed by incubation for 24 h with 10  $\mu$ M HNE. MMP-13 levels were assayed in the culture media. Values are expressed as means  $\pm$  S.E. (n= 6). Statistics: Student's unpaired t test; \*\* p<0.01.

**Figure 6. Activation of proMMP-13 *in vitro* and HNE/MMP-13 adducts formation.** (A) Recombinant proMMP-13 was incubated for 1 h at 37°C with HNE at different MR of proMMP-13 vs HNE. APMA treatment was used as positive control. The enzymatic activity was then assayed and expressed as percentage of control. (B) Samples were then subjected to western blotting to evaluate the proteolysis process of the proMMP-13 using anti-pro or active MMP-13 antibody or to identify the HNE/MMP-13 adducts formation using anti-HNE antibody. Data are expressed as means  $\pm$  S.E. (n= 6). Statistics: Student's unpaired t test; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

Figure 1

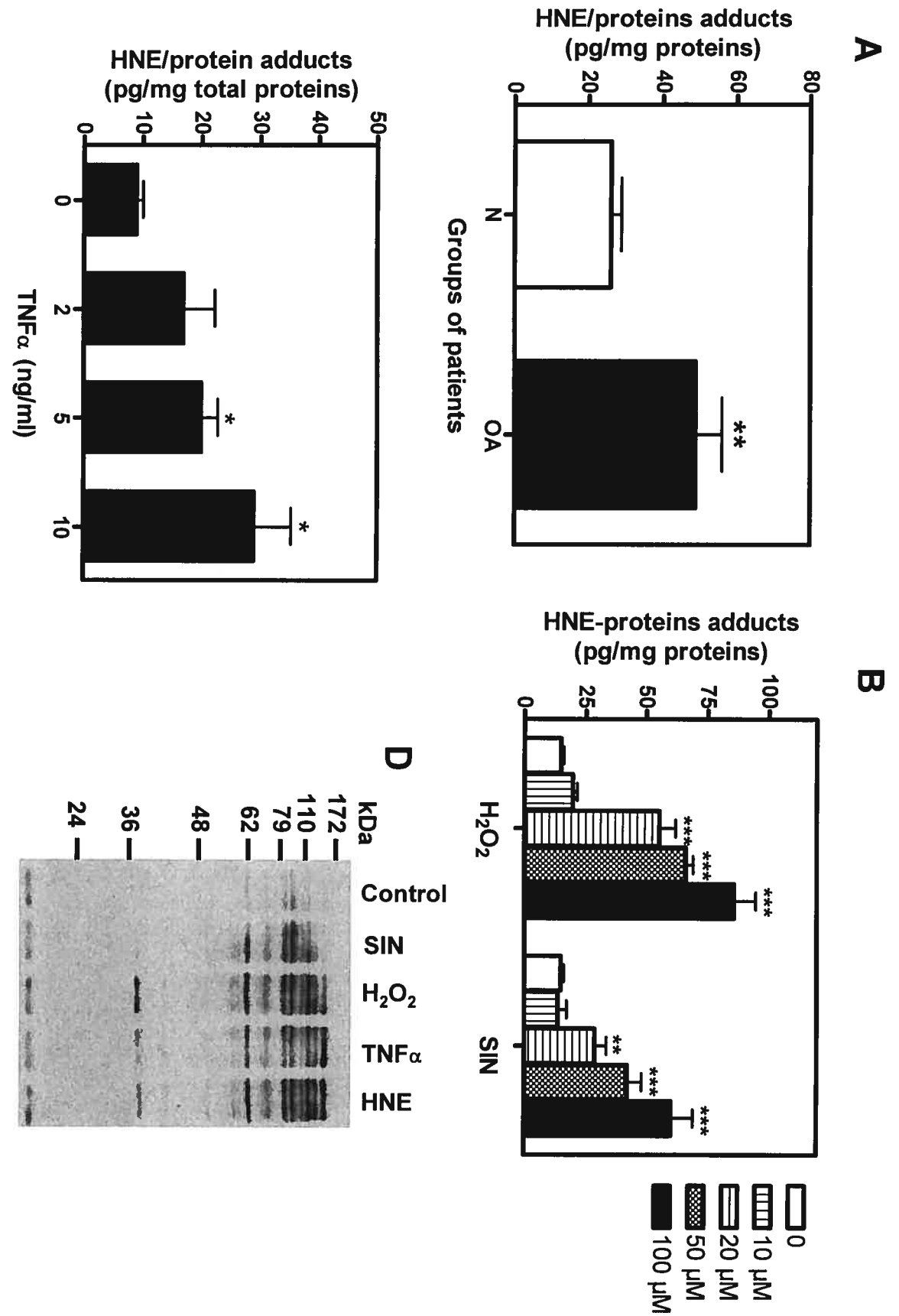
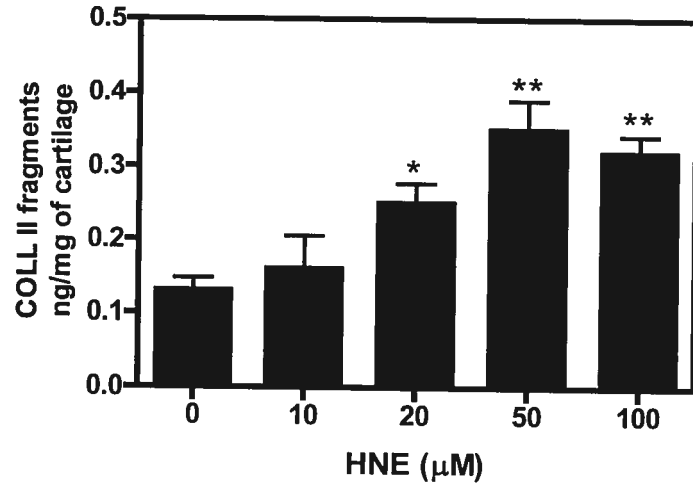
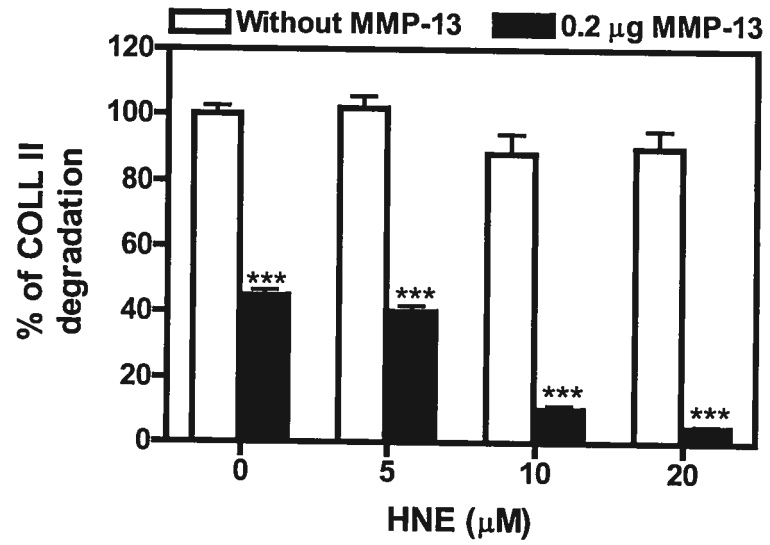
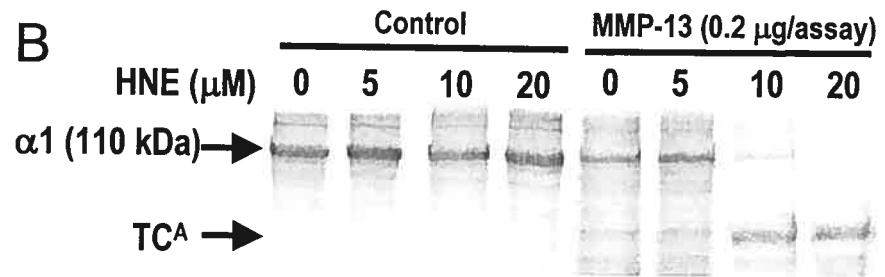


Figure 2

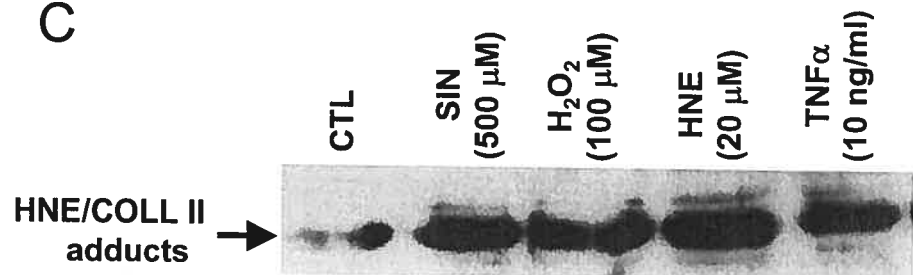
A



B



C



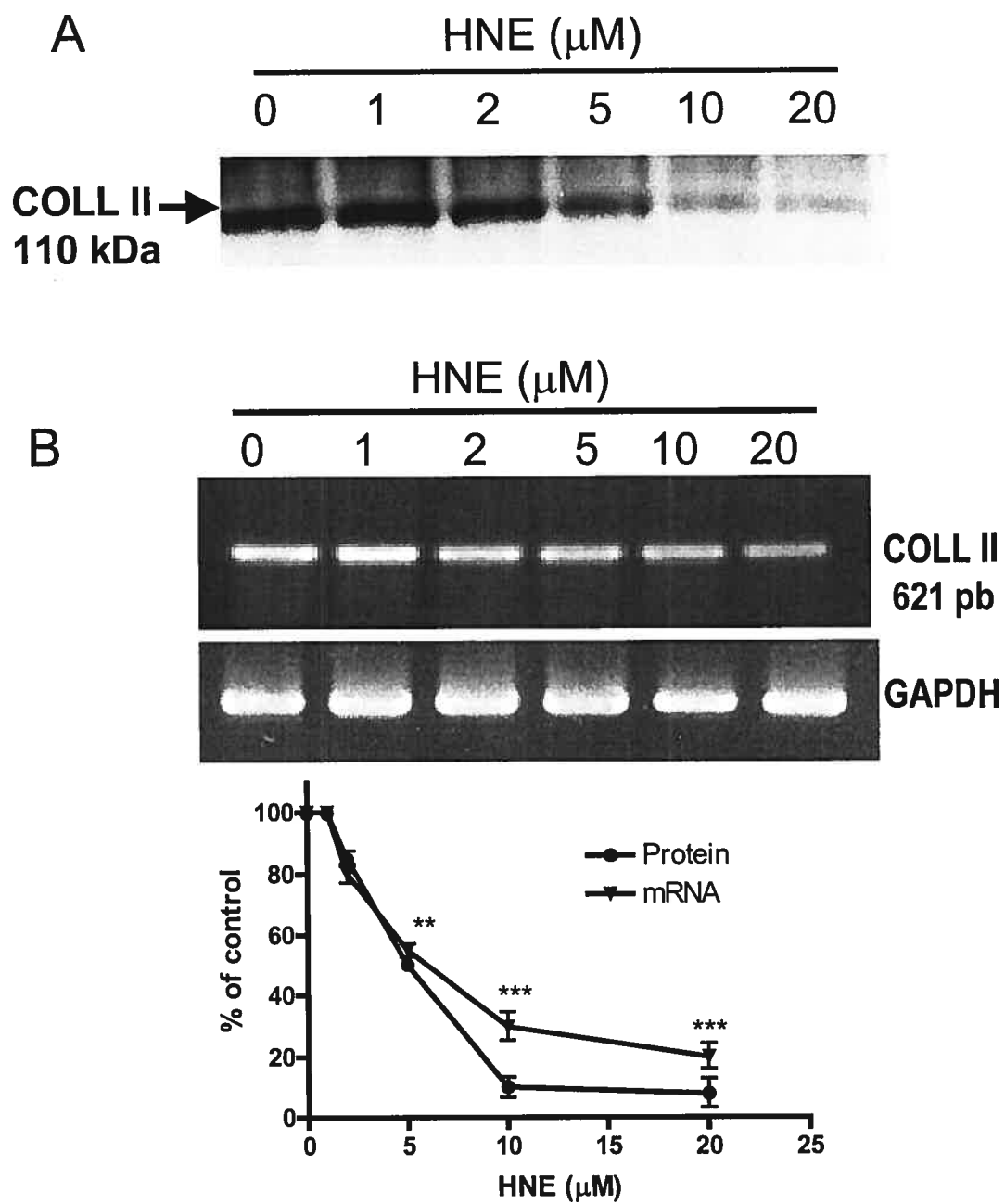
**Figure 3**



Figure 4

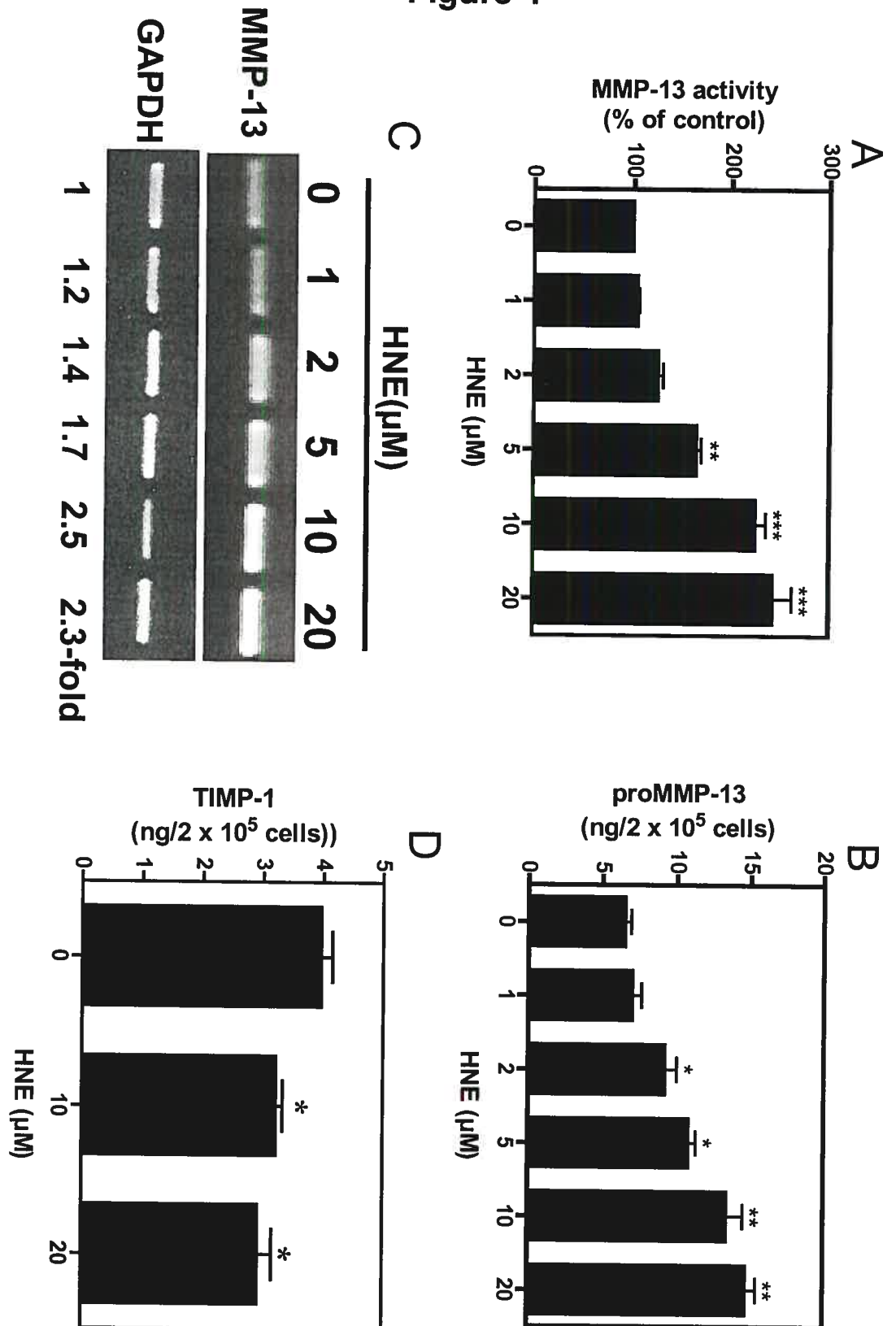
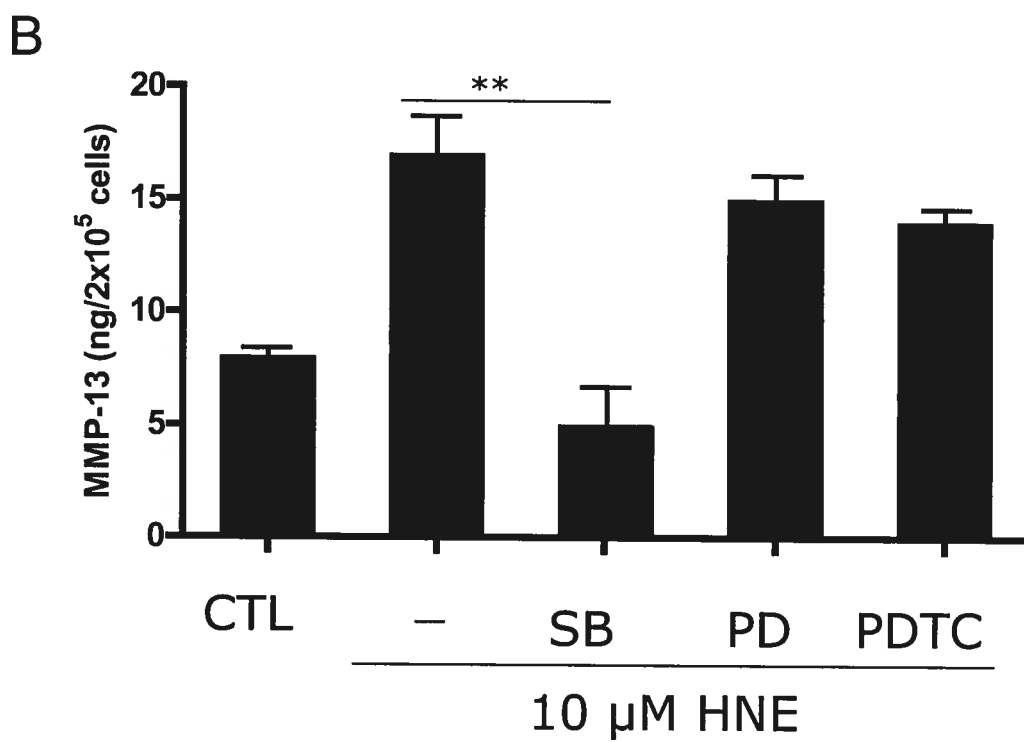
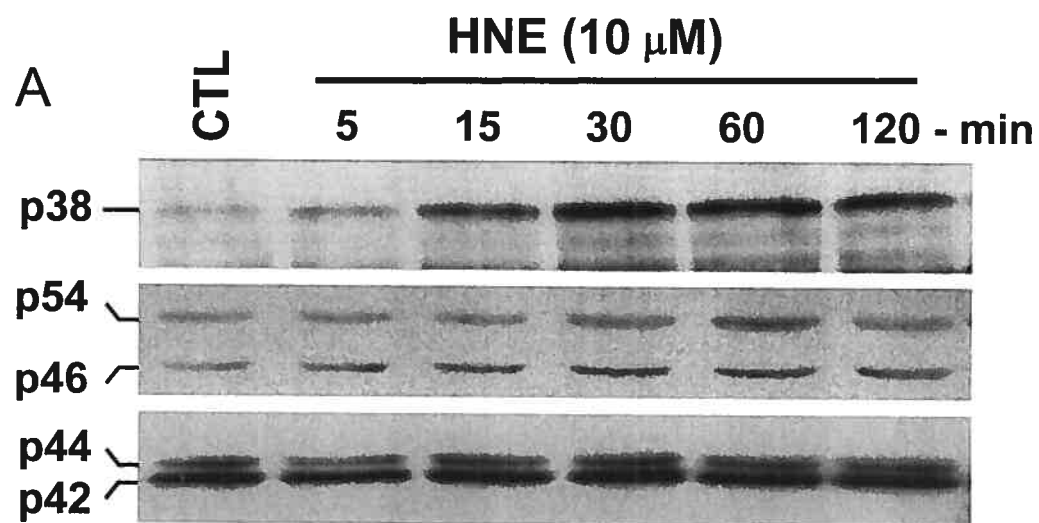
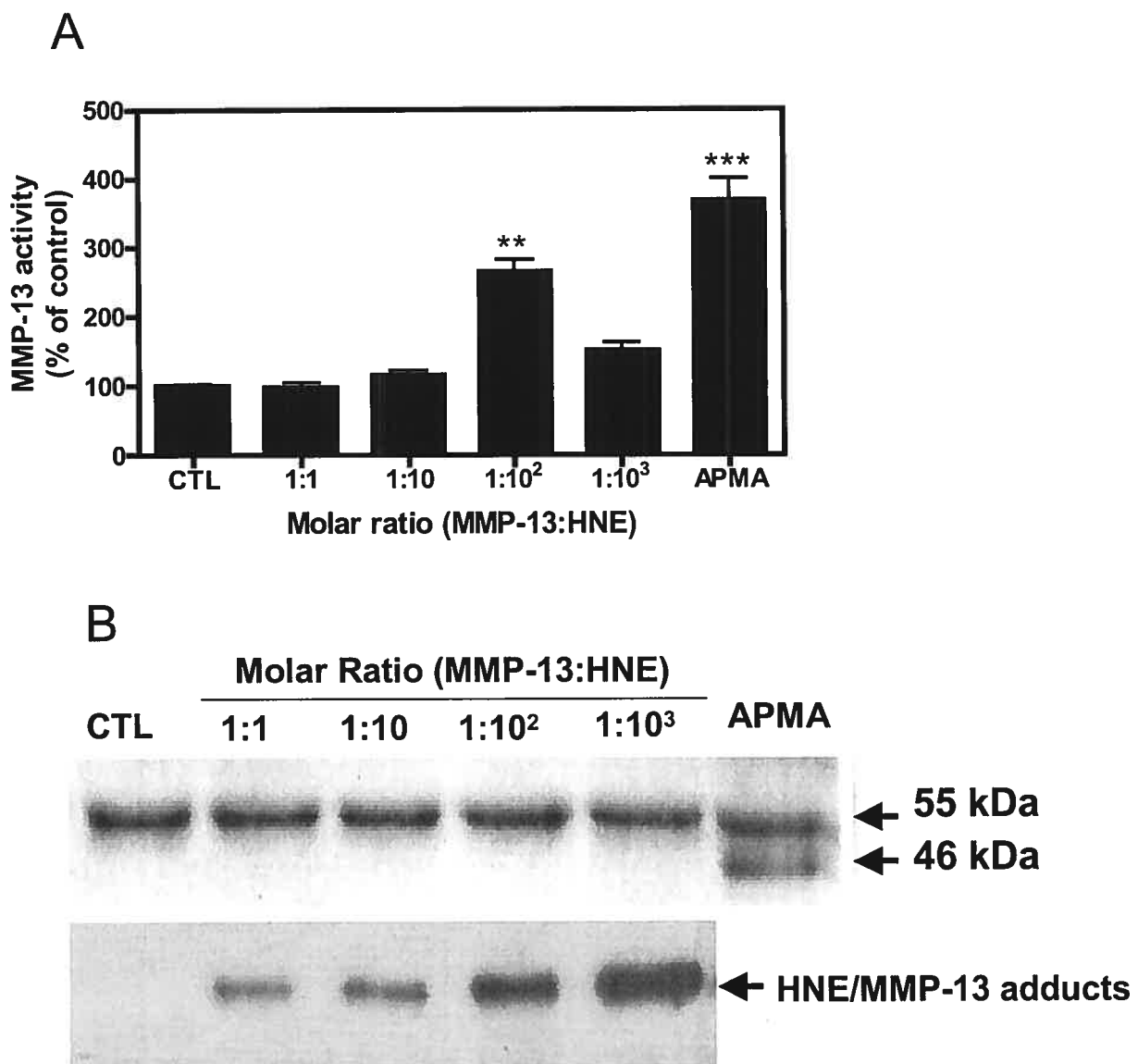


Figure 5



**Figure 6**

## Reference List

- (1) Radin EL, Burr DB, Caterson B, Fyhrie D, Brown TD, Boyd RD. Mechanical determinants of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 21(3 Suppl 2):12-21.
- (2) Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1):27-35.
- (3) Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25(4):254-272.
- (4) Eyre D. Collagen cross-linking amino acids. *Methods Enzymol* 1987; 144:115-139.
- (5) Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1973; 297(2):456-472.
- (6) Stoop R, van der Kraan PM, Buma P, Hollander AP, Poole AR, van den Berg WB. Denaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis. Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage. *J Pathol* 1999; 188(3):329-337.
- (7) Saxne T, Heinegard D. Matrix proteins: potentials as body fluid markers of changes in the metabolism of cartilage and bone in arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:71-74.
- (8) Cawston TE, Curry VA, Summers CA, Clark IM, Riley GP, Life PF et al. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 1998; 41(10):1760-1771.
- (9) Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998; 102(12):2115-2125.
- (10) Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1534-1545.
- (11) Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by

human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1996; 97(9):2011-2019.

- (12) Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97(3):761-768.
- (13) Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P et al. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1 $\beta$ . *J Rheumatol* 2002; 29(6):1262-1272.
- (14) Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 1996; 271(26):15703-15707.
- (15) Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1 $\beta$ -induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol* 2003; 19(4):203-214.
- (16) Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H. Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Rheum* 1986; 29(3):379-387.
- (17) Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297(5584):1186-1190.
- (18) Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; 276(44):41279-41287.
- (19) Shabani F, McNeil J, Tippet L. The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Radic Res* 1998; 28(2):115-123.
- (20) Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl):715S-724S.

- (21) Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 42(4):318-343.
- (22) Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Facchini A. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol* 2003; 30(2):345-347.
- (23) Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11(1):81-128.
- (24) Leonarduzzi G, Robbesyn F, Poli G. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(11):1694-1702.
- (25) Chen J, Henderson GI, Freeman GL. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(11):1919-1927.
- (26) Benderdour M, Charron G, Deblois D, Comte B, Des RC. Cardiac mitochondrial NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development. *J Biol Chem* 2003; 278(46):45154-45159.
- (27) Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29(8):1039-1049.
- (28) Roy-Beaudry M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, M'Barek KN, Christgau S, Shipkolye F et al. Endothelin 1 promotes osteoarthritic cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10):2855-2864.
- (29) Cahuana GM, Tejedo JR, Jimenez J, Ramirez R, Sobrino F, Bedoya FJ. Involvement of advanced lipooxidation end products (ALEs) and protein oxidation in the apoptotic actions of nitric oxide in insulin secreting RINm5F cells. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(10):1963-1971.
- (30) Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA, Carmona P, Hernandez-Munoz I, Siles E et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000; 275(18):13353-13361.
- (31) Laskey RE, Mathews WR. Nitric oxide inhibits peroxynitrite-induced production of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes in phosphatidylcholine liposomes. *Arch Biochem Biophys* 1996; 330(1):193-198.

- (32) Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem* 1998; 69(1):19-29.
- (33) Spreng D, Sigrist N, Schweighauser A, Busato A, Schawalder P. Endogenous nitric oxide production in canine osteoarthritis: Detection in urine, serum, and synovial fluid specimens. *Vet Surg* 2001; 30(2):191-199.
- (34) Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350(1):9-12.
- (35) Srivastava S, Chandra A, Wang LF, Seifert WE, Jr., DaGue BB, Ansari NH et al. Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart. *J Biol Chem* 1998; 273(18):10893-10900.
- (36) Matthey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J et al. Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. *Arthritis Rheum* 2002; 46(3):640-646.
- (37) Matthey DL, Hassell AB, Plant M, Dawes PT, Ollier WR, Jones PW et al. Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(3):164-168.
- (38) Garcia-Ruiz I, De La TP, Diaz T, Esteban E, Fernandez I, Munoz-Yague T et al. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277(34):30551-30558.
- (39) Chadjichristos C, Ghayor C, Kypriotou M, Martin G, Renard E, la-Kokko L et al. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(41):39762-39772.
- (40) Tikun ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 2000; 275(26):20069-20076.
- (41) Tikun ML, Allison GT, Naik K, Karry SK. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(3):159-166.

- (42) Tiku ML, Gupta S, Deshmukh DR. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 1999; 30(5):395-405.
- (43) Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266(4):2005-2008.
- (44) Wolff SP, Dean RT. Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J* 1986; 234(2):399-403.
- (45) Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(6):1521-1525.
- (46) Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 1987; 262(20):9895-9901.
- (47) Prockop DJ. Mutations in collagen genes as a cause of rare and perhaps common diseases of connective tissue. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1991; 379:55-57.
- (48) Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* 1980; 23(4):455-463.
- (49) Monboisse JC, Poulin G, Braquet P, Randoux A, Ferradini C, Borel JP. Effect of oxy radicals on several types of collagen. *Int J Tissue React* 1984; 6(5):385-390.
- (50) Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000; 43(4):801-811.
- (51) Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003; 288(1):208-217.
- (52) Usatyuk PV, Natarajan V. Role of mitogen-activated protein kinases in 4-hydroxy-2-nonenal-induced actin remodeling and barrier function in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279(12):11789-11797.
- (53) Bescond A, Augier T, Chareyre C, Garcon D, Hornebeck W, Charpiot P. Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(2):498-503.



- (54) Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 1996; 271(3):1544-1550.
- (55) Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H et al. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271(29):17124-17131.
- (56) Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(1):364-368.
- (57) Burcham PC, Kaminskis LM, Fontaine FR, Petersen DR, Pyke SM. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. *Toxicology* 2002; 181-182:229-236.

## **CHAPITRE IV :**

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

De nombreuses études ont montré que le stress oxydatif contribue à la pathophysiologie de l'OA causée par une production accrue de ROS en particulier le NO et par un déficit du système antioxydant (Rathakrishnan et al. 1993; Tiku et al. 1990; Tiku et al. 2000). Dans différents tissus, l'effet cytotoxique des ROS se traduit en partie par la production d'aldéhydes toxiques lors du processus de la LPO tels que le MDA et le HNE. La contribution de cet aldéhyde, le HNE, dans la pathogenèse et/ou la pathophysiologie de plusieurs maladies où le stress oxydatif est présent a été mise en évidence (Smith et al. 1998). Parmi les maladies dans lesquelles le HNE est impliqué on peut citer le cancer, l'athérosclérose, l'ischémie/reperfusion, l'hépatite et les maladies neuro-dégénératives (Sayre et al. 1997; Paradis et al. 1997). Le HNE est capable de former des complexes avec les biomolécules comme les protéines, l'ADN et d'agir dans des voies de signalisation (Yang et al. 2003). A ce jour, aucune étude n'a révélée son implication dans la pathophysiologie de l'OA. Une seule étude scientifique au sujet de la production de MDA et de HNE dans les synoviocytes OA a été publiée jusqu'à présent (Grigolo et al. 2003). Les auteurs ont démontré que le niveau de ces aldéhydes est plus élevé dans les synoviocytes OA comparé aux normaux.

## **Production du HNE**

Le principal but de ce travail dans le contexte d'un mémoire était de mettre en évidence l'implication du HNE dans la pathophysiologie de l'OA. De nombreuses études ont rapporté une augmentation accrue des ROS dans

différents tissus articulaires OA. Dans un modèle de chien OA, Spreng et al. (2001) ont mesuré une plus grande concentration de NO dans le sérum, l'urine et le liquide synovial par rapport aux chiens normaux. Le NO en présence d'O<sub>2</sub> donne l'anion peroxynitrique (ONOO<sup>-</sup>), un ROS très réactif et capable d'accroître l'induction de la LPO et donc la production de MDA et HNE (Violi et al. 1999). Dans la présente étude, nous avons aussi documenté *in vitro* la production du HNE par les chondrocytes OA. Les chondrocytes OA ont été stimulés avec des concentrations croissantes des donneurs de RL, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le 3-morpholinosydnimine (SIN). Les résultats montrent que ces deux donneurs de ROS sont capables d'induire la génération du HNE dans l'extrait cellulaire de chondrocytes OA de façon dose dépendante. De la même manière, l'incubation des chondrocytes OA avec le TNF- $\alpha$  stimule la production de HNE. L'ensemble de ces résultats montre que la production du HNE dans les chondrocytes OA est étroitement liée à l'augmentation du stress oxydatif. En plus, dans différents types cellulaires il a été démontré que l'effet cytotoxique des ROS se traduit inévitablement par la production d'aldéhydes lors de la LPO. Le niveau intracellulaire de HNE est contrôlé par des antioxydants et par des enzymes spécifiques impliquées dans son métabolisme telles que la glutathione-S-transferase, l'aldéhyde déshydrogenase et l'aldose reductase. En pratique, il serait intéressant de démontrer dans une autre étude ultérieure que les chondrocytes OA produisent le HNE à un niveau plus élevé comparé aux normaux et ceci à cause d'une altération de l'activité/expression de ces enzymes métaboliques.

Nos résultats montrent une augmentation significative de la présence du HNE endogène dans le liquide synovial de patients atteints d'OA comparativement aux sujets normaux. Il a été rapporté que le HNE endogène dans des conditions physiologiques (concentrations inférieures à 1  $\mu$ M) agit comme une molécule de signalisation (Esterbauer et al. 1991). Toutefois, dans les conditions pathologiques et en présence de stress oxydatif, sa concentration peut atteindre les mM (Uchida et al. 2003). Il peut être alors utilisé comme marqueur secondaire de propagation du stress oxydatif.

L'intérêt de la recherche pour les complexes HNE / protéine n'est pas limité, cependant, à leur utilisation comme marqueurs du stress oxydatif. Leur formation est proposée comme des événements clés reliés aux effets des ROS incluant (i) l'inhibition des enzymes du métabolisme énergétique et de transports d'électrons (Chen et al. 2001, Musatov et al. 2002), (ii) l'activation, par phosphorylation, de certaines des protéines kinases telles que la p38 MAPK et la JNK (Kumagai et al. 2002, Uchida et al. 2003, Liu et al. 2001, Forman et al. 2003), (iii) la perturbation des contractions du myocarde et l'induction de l'apoptose (Leonarduzzi et al. 2000, Poli et al. 2000, Cheng et al. 2001, Yang et al. 2003) et (iv) la modification des composants de la MEC du cartilage (Tiku et al. 2003).

### **Régulation du COLL II et de la MMP-13 par le HNE**

Dans un deuxième volet de cette étude, nous avons investigué la contribution du HNE dans la dégradation du cartilage OA via des

modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles du COLL II et la MMP-13.

### ***Régulation du COLL II***

Tout d'abord, nous avons montré que le HNE inhibe de manière dose dépendante la synthèse du COLL II au niveau protéique et de l'ARNm dans les chondrocytes OA. Dans la littérature, il a été démontré que l'IL-1 $\beta$  supprime l'expression du COLL II dans les chondrocytes en diminuant l'activité transcriptionnelle du gène du COLL II, le COL2A1 (Goldring et al. 1994). Dans les chondrocytes, la régulation transcriptionnelle de la région promotrice du COLL II fait intervenir plusieurs facteurs de transcription tels que le SOX9, L-SOX5 et SOX6 ainsi que la Sp1 et Sp3 en se regroupant pour former un complexe liant ce gène (Ghayor et al. 2000; Zhou et al. 1998). Chadjichritos et al. (2003) suggèrent que les Sp1 et Sp3 médient l'effet diminutif de l'IL-1 $\beta$  sur la transcription du COL2A1. Dans une étude semblable à la notre, Garcia-Ruiz et al. (2002) ont démontré que l'effet inhibiteur de la MDA sur la production du COLL I est attribué en partie à la diminution de la synthèse des facteurs Sp1 et Sp3 ainsi que leur liaison à la région régulatrice de ce gène. Nous suggérons que le HNE pourrait agir de la même façon que le MDA. Une étude plus poussée de l'effet du HNE sur ces facteurs de transcription liant le COL2A1 pourrait clarifier l'action de cet aldéhyde dans ce processus transcriptionnel.

Par ailleurs, nous avons observé que la modification du COLL II articulaire par le HNE accélère sa dégradation par la MMP-13 active. Le HNE seul n'a cependant pas entraîné de dégradation significative du COLL II. Il a été démontré dans des études antérieures que les protéines oxydées sont plus susceptibles à la dégradation protéolytique (Sadman et al. 1991). Le mécanisme de la dégradation oxydative du collagène se fait en deux étapes : une première étape d'oxydation de la protéine suivie d'une deuxième étape de clivage du collagène oxydé. D'après l'étude de Davies et al. (1987), il s'avère que des protéines incubées avec des donneurs de ROS sont altérées au niveau structurel et fonctionnel. De même, en présence de ROS, le collagène est oxydé et devient plus susceptible à la protéolyse enzymatique (Mukhopadhyay et al. 1994; Greenwald et al. 1980 ; Monboisse et al. 1984). Kato et al. (1992) ainsi que Wolff et al. (1986) ont suggéré que l'oxydation des résidus prolines du collagène se traduise par la fragmentation de la protéine accompagnée par la formation d'un produit final de dégradation, le 2-pyrrolidone. Dans une étude précédente, il a été démontré le MDA engendre des modifications au niveau du collagène en le rendant susceptible à la dégradation enzymatique (Tiku et al. 2003). Connaissant les propriétés chimiques du HNE de se fixer uniquement sur les résidus CYS, LYS, et HIS, nous suggérons de manière semblable que cet aldéhyde engendre une modification de la structure du COLL II. Cependant, à cause de la non réactivité du HNE avec les résidus prolines l'hypothèse selon laquelle il induirait une dégradation spontanée est mise de côté.

### ***Régulation transcriptionnelle de la MMP-13***

La MMP-13 est retrouvé dans peu de tissu sain de l'organisme. Dans le cartilage OA, elle est exprimée en grande quantité et joue ainsi un rôle prédominant dans son catabolisme. Nos résultats montrent qu'en présence du HNE l'expression de la MMP-13 au niveau protéique et ARNm augmente de façon dose dépendante dans les chondrocytes OA. L'investigation des voies de signalisation a révélée que le HNE active fortement la p38 MAPK et légèrement les p44/42 et p54/46 MAPK. Nous avons montré aussi que la stimulation de la MMP-13 par le HNE diminue seulement en présence de l'inhibiteur de la p38 MAPK. En outre, récemment nous avons obtenu des résultats préliminaires montrant que le HNE augmente la liaison du complexe AP-1 sur l'ADN (résultats non présentés).

Au niveau intracellulaire, la régulation de la MMP-13 se fait via l'activation de MAPKs. Mengshol et al. (2000) ont démontré que l'induction de l'expression de cette enzyme par l'IL-1 $\beta$  requiert la p38 MAPK, la JNK ainsi que la NF- $\kappa$ B. De même, Liacini et al. (2002) ont souligné l'implication de ERK, JNK et NF- $\kappa$ B dans cette régulation. Généralement, ces MAPKs activent plusieurs facteurs de transcription dont le complexe AP-1 et augmentent la liaison de ce facteur sur la région promotrice. Comme mentionné ci-dessus, le site AP-1 fait partie du promoteur de la plupart des MMPs. Il est connu pour jouer un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des MMPs (Vincenti et al. 1998). Sa mutation abolit à 90% l'expression basale et induite de la MMP-13 dans les chondrocytes.

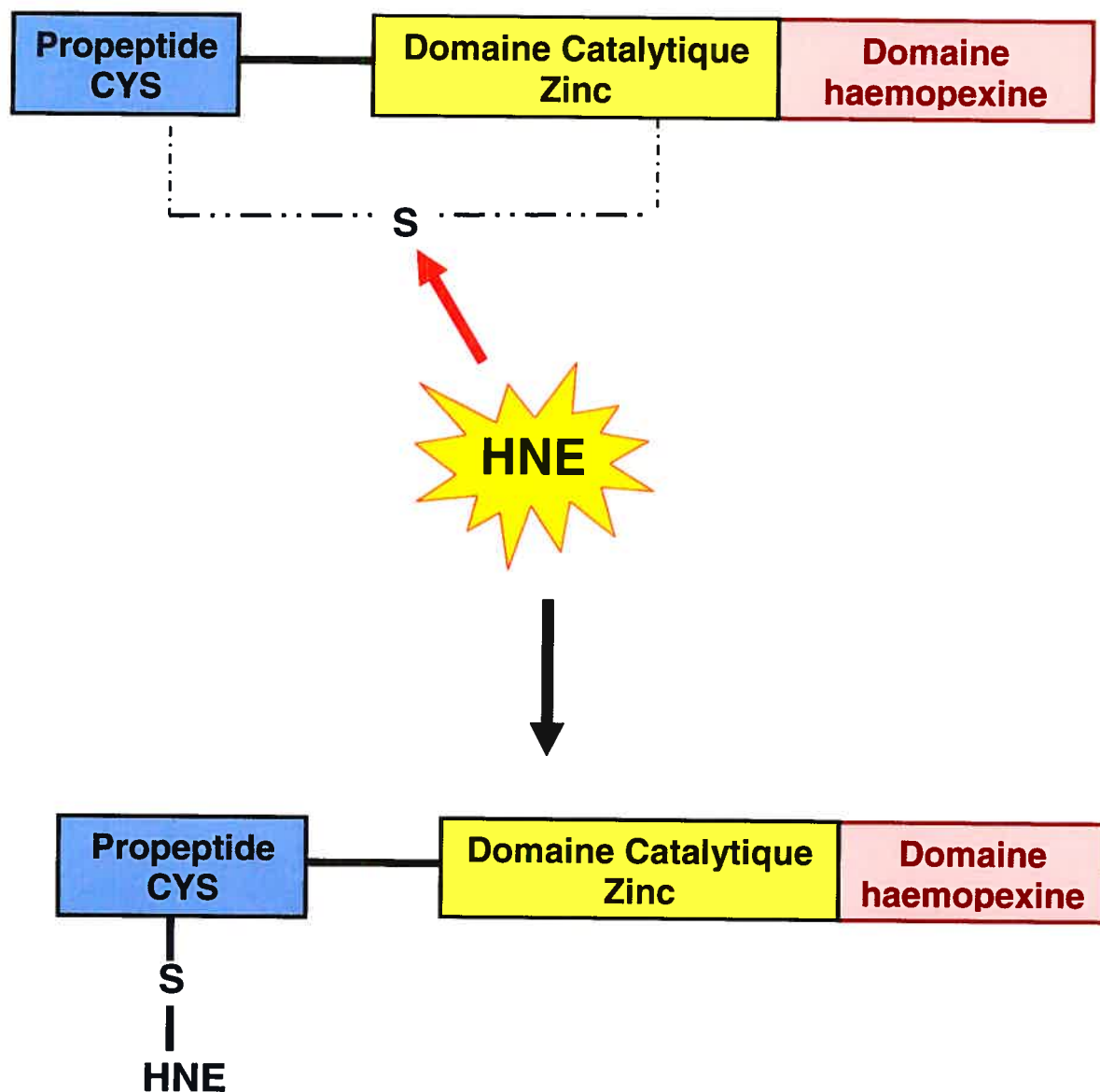


Le HNE agit au niveau de la voie de signalisation dans différents types cellulaires. Il active la p54/46, la p44/42, induit la synthèse de c-fos et c-jun et augmente l'activité de liaison de l'AP-1 (Ruef et al. 1997). Par ailleurs, avec ses propriétés de se lier aux protéines, le HNE est capable d'activer certaines protéines kinases sans provoquer une cascade de phosphorylation. Ce phénomène a été observé pendant l'activation des isoformes de JNK par le HNE. Lorsque ce dernier se lie à cette enzyme, il y a formation d'un complexe HNE/JNK, une translocation et activation de JNK de façon indépendante de la phosphorylation (Parola et al. 1998). En plus, le HNE est tantôt décrit comme un inhibiteur, tantôt comme un activateur du facteur NF- $\kappa$ B tout dépend du type cellulaire étudié et de la concentration utilisée (Ruef et al. 2001). L'ensemble de ces résultats suggère que cet aldéhyde agit en partie sur l'expression de la MMP-13 au niveau transcriptionnel via l'activation du facteur AP-1 médié probablement par p-38 MAPK.

### ***Régulation post-traductionnelle de la MMP-13***

La MMP-13 est un enzyme catalytique qui dégrade plusieurs constituants de la MEC. Au niveau post-traductionnel, l'activation de la proMMP-13 se fait essentiellement par le mécanisme «cystéine switch». Parmi les mécanismes d'activation de la proMMP-13, le plus connu est celui médié par L'APMA. Elle engendre la dégradation de cet pro-enzyme en deux fragments de 60 et 46 kDa en le clivant (i) au niveau du pont CYS-Zn<sup>2+</sup> et (ii) au niveau de la liaison entre le pro-domaine et le domaine catalytique. Un autre mécanisme d'activation de la proMMP-13 a été proposé aussi par Knauper et al. (1996).

Ils ont mis en évidence l'activation de la proMMP-13 par la MMP-MT1 associé à la MMP-2 via le clivage du pro-peptide en Lys<sup>38</sup> – Glu<sup>39</sup> et Arg<sup>76</sup> – Cys<sup>77</sup> suivi par une autoprotéolyse. Curieusement, nos résultats nous montrent une activation de la MMP-13 sans clivage protéolytique. Fait intéressant, Bescond et al. (1999) ont démontré que l'activation d'une autre MMP, la proMMP-2, se fait sans protéolyse. Cette enzyme pourrait être activée par l'acide aminé homo cystéine via le mécanisme «cystéine switch» sans pour autant cliver la liaison entre le pro-domaine et le domaine catalytique. Cette activation, qui semble être réversible en excès d'homo cystéine, nécessite la liaison de cet acide aminé avec l'enzyme. Dans notre étude, nous pensons qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme d'activation semblable. La MMP-13 recombinante a été mise en incubation avec des concentrations croissantes de HNE. Nous avons constaté que le HNE active la MMP-13 à un ratio molaire de 1 :100 (MMP-13 versus HNE) et que cette activation n'est pas associée avec un clivage de l'enzyme tel que révélé par western blot. En outre, par la même méthode, nous avons démontré que l'effet du HNE sur l'activité de la MMP-13 est le résultat de la formation des complexes HNE/MMP-13. Ces résultats suggèrent que cette activation serait due à un changement structural de la protéine. Il semblerait que le HNE active la MMP-13 en clivant seulement l'interaction Cys-Zinc tel que proposé dans la figure 13. Par ailleurs, l'étude des caractéristiques biochimiques de la MMP-13 en présence du HNE à savoir affinité, vitesse maximale, demi-vie, pourraient apporter une meilleure compréhension de l'activité de cette enzyme en présence d'un stress oxydatif.



**Figure 13:** Mécanisme proposé de l'activation de la MMP-13 par le HNE.

## **CHAPITRE V : CONCLUSION**

C'est la première étude à démontrer l'implication du HNE dans la pathophysiologie de l'OA. Nos résultats apportent de nouvelles connaissances sur le rôle du HNE dans la déstabilisation des macromolécules du cartilage et dans l'activation/expression de la MMP-13. Le HNE engendre la diminution de la synthèse du COLL II et l'augmentation de sa susceptibilité à la dégradation enzymatique. Il induit l'augmentation de la synthèse et de l'activité de la MMP-13. Ces effets sont médiés via la formation de complexes HNE / protéine. De même, une augmentation significative de la concentration de HNE lié aux protéines dans le liquide synovial OA et dans les chondrocytes OA incubés avec des agents oxydants a été mise en évidence.

Plusieurs perspectives s'offrent suite à cette nouvelle approche. La compréhension du métabolisme du HNE ainsi que son rôle dans l'inflammation articulaire et l'apoptose des chondrocytes restent à être investigués.

La dégradation du cartilage est le phénomène central dans l'évolution de l'OA et s'accompagne d'autres affectations touchant entre autre la membrane synoviale et l'os. D'un point de vue clinique, la détection de complexes HNE / protéine comme marqueur biologique s'avèraient intéressant dans le diagnostic de la progression de l'OA et l'établissement d'un traitement adapté au stade de l'OA. Cette approche qui toutefois devrait

être validé pourrait s'avérer complémentaire et efficace avec l'utilisation d'autres marqueurs de l'OA (Vignon et al. 2001).

## **CHAPITRE VI : RÉFÉRENCES**

Alary J, Debrauwer L, Fernandez Y, Cravedi JP, Rao D, Bories G. (1998) 1,4-dihydroxynonene mercapturic acid, the major end metabolite of exogenous 4-hydroxy-2-nonenal, is a physiological component of rat and human urine. *Chem Res Toxicol.* 11(2):130-5.

Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. (1997). Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* 40(6):1050-3.

Awasthi Y. C., Sharma R., Cheng J.Z., Yang Y., Sharma A., Singhal S.S., Awasthi S. (2003). Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.* 24: 219-230

Aszodi A, Pfeifer A, Wendel M, Hiripi L and Fassler R (1998); Mouse models of extra cellular matrix diseases. *J. Mol. Med* 76: 238-252.

Baker A. H., Edwards D. R., Murphy G. (2002) Metalloproteinase Inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell. Sci.* 115:3719-3727.

Bau B. Gebhard Pia M., Haag J., Knorr T., Bartnik E., and Aigner Thomas. (2002). Relative Messenger RNA Expression Profiling of Collagenases and Aggrecanases in Human Articular Chondrocytes In Vivo and In Vitro. *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 46, No. 10, pp. 2648-2657

Belaaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman GA, Shapiro SD. (1995). Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J Biol Chem.* 270(24):14568-75.

Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P, Martel-Pelletier J. (2002) Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent



activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1 $\beta$ . *J Rheumatol.* 29(6):1262-72.

Benderdour M., Charron G., Deblois D., Comte B., Desrosiers C. (2003) Cardiac mitochondrial NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adducts formation: an event that precedes hypertrophy development. *JBC.* 278(46): 45154- 45159.

Bennaars-Eiden A, Higgins L, Hertzler AV, Kapphahn RJ, Ferrington DA, Bernlohr DA, (2002). Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem.* 277(52):50693-702.

Bergman I, Loxley R. (1969). Lung tissue hydrolysates: studies of the optimum conditions for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analyst.* 94(120):575-84.

Bescond A, Augier T, Chareyre C, Garcon D, Hornebeck W, Charpiot P. (1999). Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263(2):498-503.

Billinghurst RC, Dahlberg L, Lonescu M, Bourne R, Rorabeck C., Mitchell P, Hambor J, Diekmann, Tschesche H, Chen J, Van wart H, Polle AR. (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritis articular cartilage. *J Clin. Invest.* 99(7): 1534 -1545.

Bonassar LJ, Stinn JL, Pagnio C. G., Frank EH, Moore VL, Lark MW, Sandy JD, Hollander AP, Poole AR, Grodzinsky AJ. (1996) Activation and inhibition of endogenous matrix metalloproteinase are in articular cartilage: effects on composition and biophysical properties. *Arch. of biochem. And biophysics.* 333 (2): 359 -367.

Bosh-Morell F., Flohe L., Marin N., Romero F. J.(1999) 4-hydroxynonenal inhibits glutathione peroxide: protection by glutathione. *Free Radic Biol Med* 26: 1383-1387

Bruce Alberts, Bray D., Lewis J., Raff D., Roberts K., Watson J. D. (2000) *Biologie moléculaire de la cellule* (3e ed.) Médecine-sciences. Flammarion.

Bruckner S. R., Estus S. (2002) JNK3 contributes to c-jun induction and apoptosis in 4-hydroxynonenal-treated sympathetic neurons. *J Neurosci. Res* 70: 665-670.

Burcham PC, Kaminskas LM, Fontaine FR, Petersen DR, Pyke SM. (2002) Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. *Toxicology*; 181-182:229-236

Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW, Tschesche H., (1986). Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Rheum.* 29(3):379-87.

Bulteau A. L., Lundberg K. C., Humphries K. M., Sadek H. A., Szveda P. A., Friguet B., Sweda L.. I., (2001). Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *JBC* 276: 30057-30063

Cahuana GM, Tejedo JR, Jimenez J, Ramirez R, Sobrino F, Bedoya FJ.(2003). Involvement of advanced lipooxidation end products (ALEs) and protein oxidation in the apoptotic actions of nitric oxide in insulin secreting RINm5F cells. *Biochem Pharmacol*; 66(10):1963-1971.

Camandola S., Poli G., Mattson M. P., (2000) The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J. Neurochem* 74: 159-168

Chadjichristos C., Ghayor G., Kypriotou M., Martin G., Renard E., Ala-Kokko L., Suske H., de Crombrughe B., Pujol J.-P., and Galéra Philippe (2003). Sp1 and Sp3 Transcription Factors Mediate Interleukin-1 $\beta$  Down-Articular Chondrocytes. *JBC* 278(41):39762-39772

Chen J, Henderson GI, Freeman GL. Role of 4-hydroxynonenal in modification of cytochrome c oxidase in ischemia/reperfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(11):1919-1927.

Cheng JZ, Sharma R, Yang Y, Singhal SS, Sharma A, Saini MK, Singh SV, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. (2001). Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *J Biol Chem*. 276(44):41213-23. Epub 2001 Aug 24.

Christgau S., Garnero P., Fledelius C., Moniz C., Ensig M., Gineyts E., Rosenquist C., Qvist P. (2001). Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 29 (3): 209 –215

Cleaver CS, Rowan AD, Cawston TE, (2001). Interleukin 13 blocks the release of collagen from bovine nasal cartilage treated with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis*. 60(2):150-7.

Cohn J. A., Tsai L., Friguet B., Szweda L.I., (1996) Chemical characterization of a protein-4-hydroxy-2-nonenal cross-link: immunochemical deletion in mitochondria exposed to oxidative stress. *Arch. biochem. Biophys*. 328: 158-164.

Cowan K., Storey KB. (2003) Mitogen-activated protein kinases: new signalling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Jour. Of exper. Bio.* 206: 1107- 1115.

Curran S., Murray GI., (1999). Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 189(3):300-8. Review.

Davies KJ. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem.* 262(20):9895-901.

Del Carlo M. Jr., and Loeser R. F. (2003). Increased Oxidative Stress With Aging Reduces Chondrocyte Survival: Correlation With Intracellular Glutathione Levels. *Arthritis & Rheumatism.* 48(12 ):3419-3430

Dianzani M. U. (2003). 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol. Aspects of medicine.* 24: 263-272.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G, (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 89(5):747-54.

Eaton P, Li JM, Hearse DJ, Shattock MJ, (1999). Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *Am J Physiol.* 276(3 Pt 2):H935-43.

Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T, (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem.* 275(12):8695-702.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11(1):81-128.

Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J., (2001) Peroxisome proliferator--activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 44(3):595-607.

Firestein GS., Manning AM. (1999) Signal transduction and transcription factors on rheumatic disease. *Arth. & Rheum. Review* 42 (4): 609-621

Flannery CR., Little CB., Hughes CE., Caterson B. (1999) Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. *Biochem. And Biophysics. res. Com.* 260:318-322.

Forman HJ., Dickinson DA. Iles KE. (2003) HNE-signalling pathways leading to its elimination. *Mol. Aspects of Med.* 24: 189-194.

Friguet B., Szweda L.I., (1997) Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Lett* 405:21-25.

Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER. (1983) Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(6):1521-5.

Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P. (2000). Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem.* 275(35):27421-38.

Goldring MB, Fukuo K, Birkhead JR, Dudek E, Sandell LJ. (1994). Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II

collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem.* 54(1):85-99.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 74(2):111-22.

Grabowski PS, Wright PK, Van 't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. (1997) Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 36(6):651-5.

Garcia-Ruiz I, de la Torre P, Diaz T, Esteban E, Fernandez I, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. (2002). Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem.*;277(34):30551-8.

Greenwald RA, Moy WW. (1980). Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* 23(4):455-63.

Grigolo B., Roseti L., Fiorini M., Facchini A. (2003) Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 30:345-347

Grune T., Michel P., Sitte N., Eggert W., Albrecht-Nebe H., Esterbauer H., Siems Werner (1997). Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases. *Free Rad. Bio. & Med.* 23 (3): 357-360.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297(5584):1186-90.

Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 274(11):6972-8.

Hattori Y, Hattori S, Kasai K. (2001) 4-hydroxynonenal prevents NO production in vascular smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappaB-dependent transcriptional activation of inducible NO synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Jul;21(7):1179-83.

Heinrich S. Wartenberg M. Hescheler J.(2001) Reactive Oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. Review. *Cell Physiol. Biochem.* 11:173-186

Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. (2003) The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarth. Cartil.*11(10):747-55.

Horton, Moran, Ochs, Rawn, Scrimgeour (1993). *Principes de biochimie.* DeBoeck University.

Ishikawa T., Esterbauer H., Sies H., (1986) Role of cardiac glutathione transferase and the glutathione S-conjugate export system in biotransformation of 4-hydroxynonenal in the heart. *J Biol Chem* 261:1576-1581

Jang D. Murrel AC. (1998). Nitric oxide in arthritis. *Free Radical Bio. & Med.* Review 24 (9): 1511- 1519.

Ji C., Kozark K. R., Marnett L. J. (2001). Ikb kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *The Journal. Of bio. Chem.* 276(21) 18223-18228

Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C, (1999). Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol.* 19(6):4431-42.

Johnson G. L., Lapadat R., (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 298(5600):1911-2

Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Benderdour M, Pelletier JP. (2000) Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(5):1134-44.

Kato Y, Uchida K, Kawakishi S. (1992). Oxidative fragmentation of collagen and prolyl peptide by Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conversion of proline residue to 2-pyrrolidone. *J Biol Chem.* 1992 Nov 25;267(33):23646-51.

Karin M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 270(28):16483-6. Review.

kaur H, Halliwell B. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett;* 350(1):9-12.

Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem;* 271(3):1544-1550.

Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H et coll. (1996). Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem;* 271(29):17124-17131.



Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89(5):755-64.

Koshy P. J. T., Lundy C. J., Rowan A. D., Porter S., Edwards D. R., Hogan A., Clark I. M., and Cawston T. E. (2002). The Modulation of Matrix Metalloproteinase and ASAM Gene Expression in Human Chondrocytes by Interleukin-1 and Oncostatin M; A Time-course Study Using Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *Arth. & rheum* 46( 4): 961-967

Kuettner KE., Memoli VA., Pauli BU., Wrobel NC., Thonar E. J-M. A., Daniel JC. (1982) Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes. In vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. *J. Cell Biol.* (93):751-757

Kumagai T, Kawamoto Y, Nakamura Y, Hatayama I, Satoh K, Osawa T, Uchida K, (2000). 4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 273(2):437-41.

Kumagai T, Nakamura Y, Osawa T, Uchida K. (2002). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in the 4-hydroxy-2-nonenal-induced cyclooxygenase-2 expression. *Arch Biochem Biophys*. 397(2):240-5.

Kumagai T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kusumi Y, Mitsumata M, Uchida K (2004). A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem*. 279(46):48389-96. Epub 2004 Sep 8.

Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. (1997). Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 17(13):5089-100.

Laskey RE, Mathews WR.(1996). Nitric oxide inhibits peroxynitrite-induced production of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes in phosphatidylcholine liposomes. *Arch Biochem Biophys* 1996; 330(1):193-198.

Leonarduzzi G., Arkan M. C., Saşağa H., Chiarpotto E., Sevanian A., Poli G. (2000) Lipid oxidation products in cell signalling. *Free Rad. Biol. & Med.* 28(9): 1370-1370 .

Leonarduzzi G., Robbesyn F., Poli G., (2004). Signaling kinases Modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radic. Biol. Med.* 37(11): 1694-702

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. (2003). Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 288(1):208-17.

Liacini A., Sylvester J., Li WQ., Zafarullah M. (2002). Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol.* 21 (3): 251-62

Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. (2000). 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 4):635-41.

Lo YYC et Cruz (1995). Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 11727- 11730.

Lo YYC., Wong JMS., Cruz TF. (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH<sub>2</sub>- terminal kinases.

Makarov Sergei (2001). NF- $\kappa$ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Commentary. Arthritis Res.*, 3:200-206.

Marieb E. N. (2005) *Anatomie et physiologie humaines* 2<sup>e</sup> ed. ERPI  
Adaptation René Lachaine.

Martel-Pelletier J., Alaaeddine N., Pelletier j-P. (1999) Cytokines and their in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience* 4, d694-703.

Martel-Pelletier J. (2000) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In *Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology*, edn 13. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins: 2195 – 2215.

Martel-Pelletier J., Welsch DJ., Pelletier J-P. (2001) Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract.& res. Clin. Rheum.* 15(5): 805-829.

Mattey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J et al, (2002). Smoking and disease severity in rheumatoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus. *Arthritis Rheum.* 46(3):640-646.

Mattey DL, Hassell AB, Plant M, Dawes PT, Ollier WR, Jones PW, Fryer AA, Aldersea JE, Strange RC (1999). Association of polymorphism in glutathione

S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Ann Rheum Dis.*;58(3):164-8.

Matrisian LM, Ganser GL, Kerr LD, Pelton RW, Wood LD. (1992) Negative regulation of gene expression by TGF-beta. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun;32(2):111-20

Mazzeti I., Grigola B., Pulsatelli L., Dolzani P., Silvestri T., Roseti L., Meliconi R., Facchini A. (2001) Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clinical science* 101: 593 –599.

Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC, (2003). Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol.* 19(4):203-214.

Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. (2000) Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 43(4):801-11.

Mengshol JA., Vincent MP., Brinckerhoff CE. (2001) IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic acids research* 29(21): 4361 – 4372.

Miller EJ., Harris ED., Chung E., Finch JE., McCroskey PA., Butler WT. (1976) Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenases: site of cleavage and primary structure at the NH<sub>2</sub>-Terminal Portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochem.* 15 (4): 787 – 792.

Milner J. M., Elliott S. F., Cawston T. E. (2001). Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways. *Arthritis Rheum*; 44(9): 2084-96.

Mitchell PG., Magna HA., Reeves LM., Lopresti-Morrow LL., Yocum SA. Rosner PJ., Geoghegan KF., Hambor JE. (1996). Cloning, expression and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from Human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest* 97(3): 761 –768.

Monboisse JC, Poulin G, Braquet P, Randoux A, Ferradini C, Borel JP (1984). Effect of oxy radicals on several types of collagen. *Int J Tissue React*. 6(5):385-90.

Moore BA, Aznavoorian S, Engler JA, Windsor LJ (2000). Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1502(2):307-18.

Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, Paju A, Konttinen YT, Stenman UH, Salo T. (2003) Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry*. 42(18):5414-20.

Monboisse JC, Poulin G, Braquet P, Randoux A, Ferradini C, Borel JP.(1984). Effect of oxy radicals on several types of collagen. *Int J Tissue React*; 6(5):385-390.

Mort JS, Billington CJ. (2001) Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res* ; 3(6):337-41.

Murrel G A, Jang D, Williams RJ. (1995) Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun.* 206:15-21.

Musatov A, Carroll CA, Liu YC, Henderson GI, Weintraub ST, Robinson NC, (2002). Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 2002 Jun 25;41(25):8212-20.

Mylonas C, Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13(3):295-309.

Nagase H. (1997). Activation mechanisms of the matrix metalloproteases. *Biol. Chem.* 378: 151-160.

Nagase H., Woessner J. F. Jr (1999). Matrix metalloproteinase's. Minireview *JBC* 274 (31): 21491-21494.

Nagase H., Kashiwagi M. (2002). Aggrecanases and cartilage matrix degradation. Review. *Arthritis Res. & Ther.* 5(2): 94-103.

Naito S. Shimizu S., Matsuu M., Nakashima T., Yamashita S., Sekine I. (2002) ETS-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(1): 130-138.

Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. (1992) Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 267(6):3581-4.

Palmer RM, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. (1993) Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 193(1):398-405.

Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. (1997) In situ detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology*. 26(1):135-42

Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonarduzzi G, Chiarugi P, Camandola S, Poli G, Waeg G, Gentilini P, Dianzani MU. (1998) HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* ;102(11):1942-50.

Camandola S., Poli G., Waeg G., Gentilini P., and Dianzani Umberto M. (1998). HNE Interacts Directly with JNK Isoforms in Human Hepatic Stellate Cells. *The American Society for Clinical Investigation Inc.*, 102(11):1942-1950.

Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and allied conditions: A textbook of rheumatology*, 13<sup>th</sup> Ed. Baltimore Williams & Wilkins; 1997, p1969-84.

Pelletier J-P., Martel-Pelletier J., Abramson S. B. (2001). Osteoarthritis, an inflammatory Disease : potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism*. 44(6): 1237 – 1247.

Petersen D. R., Doorn J. A. (2004) Serial Review: HNE as a signalling molecule. *Free Rad biol. & med.*

Poli G, Schaur RJ., (2000). 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life*. 50(4-5):315-21. Review.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S, (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. Clin Orthop Relat Res. 2001 Oct;(391 Suppl):S26-33. Review.

Radin EL, Rose RM. (1986). Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. Clin Orthop, 213: 34-40.

Rathakrishnan C, Tiku ML, (1993). Lucigenin-dependent chemiluminescence in articular chondrocytes. Free Radic Biol Med. 15(2):143-9.

Reboul P., Pelletier J-P., Tardif G., Coutier J-M., Martel-pelletier J. (1996). The new collagenases, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: A role in osteoarthritis. J. Clin. Invest. 97(9): 2011 – 2019.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Benderdour M, Ranger P, Bottaro DP, Martel-Pelletier J (2001). Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. Arthritis Rheum. 44(1):73-84.

Reginster J.-Y., Pelletier J.-P., Martel-Pelletier J., Henrotin Y. (1999). Osteoarthritis : clinical and experimental aspects. Springer.

Roy-Beaudry M., Martel-Pelletier J., Pelletier J-P., M'Barek K. N., Christgau S., Shipkolye F., Moldovan F. (2003) Endothelin 1 promotes osteoarthritis cartilage degradation via matrix metalloprotease 1 and matrix metalloprotease 13 induction. Arthritis & rheumatism 48(10) : 2855 – 2864.



Ruef J, Rao GN, Li F, Bode C, Patterson C, Bhatnagar A, Runge MS. (1998). Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Circulation*. 97(11):1071-8.

Ruef J. Moser M., Bode C., Kubler W., Runge M.S. (2001) 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells *Basic. Res. Cardiol.* 96(2): 143-50.

Stadtman ER, Oliver CN. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*. 266(4):2005-8. Review. No abstract available.

Sanchez-Alcazar JA, Schneider E, Martinez MA, Carmona P, Hernandez-Munoz I, Siles E et coll. (2000). Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem*; 275(18):13353-13361.

Sanchez-Lopez R., Alexander C. M. Behrendtsen O., Breathnach R., Werb Z. (1993) Role of Zinc binding- and hemopexin Domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenases and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *JBC* 268(10): 7238 – 7247.

Sauer H, Wartenberg M., Hescheler J., (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell. Physiol. And Biochem*. 11:173-186.

Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 68(5):2092-7

Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol aspects of Med*. 24: 149 –159.

Schroen DJ, Brinckerhoff CE, (1996). Nuclear hormone receptors inhibit matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through diverse mechanisms. *Gene Expr.* 6(4):197-207. Review.

Schroen DJ, Brinckerhoff CE., (1996). Inhibition of rabbit collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) transcription by retinoid receptors: evidence for binding of RARs/RXRs to the -77 AP-1 site through interactions with c-Jun. *J Cell Physiol.* 169(2):320-32.

Selvamurugan N, Brown RJ, Partridge NC, (2000). Regulation of collagenase-3 gene expression in osteoblastic and non-osteoblastic cell lines. *J Cell Biochem.* 79(2):182-90.

Shabani F, McNeil J, Tippet L, (1998). The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. *Free Radic Res.* 28(2):115-23.

Sharrocks A. D., Brown A. L., Ling Y., Yates P. R. (1997) The ETS-domain transcription factor family. *Int. J. Biochem Biol.* 12: 1371-1387.

Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM, Welgus HG. (1995). Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate. Differential processing and stabilization of the carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem.* 270(11):6351-6.

Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 40(11):2065-74.

Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. (1998) Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1998 Oct;44(4):696-9.

Spreng D, Sigrist N, Schweighauser A, Busato A, Schawalder P. (2001) Endogenous nitric oxide production in canine osteoarthritis: Detection in urine, serum, and synovial fluid specimens. *Vet Surg.* 2001 Mar-Apr;30(2):191-9.

Springer J. E. Azbill R. D., Mark R. J., Begley J. G., Waeg G., Mattson M. P. (1997) 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, rapidly accumulates following traumatic spinal cord injury and inhibits glutamate uptake. *J. Neurochemistry.* 68: 2469 –2476.

Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE. (1990). Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys<sup>73</sup> active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1):364-368.

Srivastava S, Chandra A, Wang LF, Seifert WE Jr, DaGue BB, Ansari NH, Srivastava SK, Bhatnagar A. (1998) Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart. *J Biol Chem.* 273(18):10893-900

Stadtman ER, Oliver CN, (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem.* 266(4):2005-8.

Stahle-Backdahl M, Sandstedt B, Bruce K, Lindahl A, Jimenez MG, Vega JA, Lopez-Otin C. (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest.* 76(5):717-28.

Stremme S., Duerr S., Bau B., Schmid E., Aigner T. (2003). MMP-8 is only a minor gene product of human adult articular chondrocytes of the knee. *Clin Exp. Rheumatol.* 21(2): 205- 209.

Suzuki K., Enghild JJ., Morodomi T., Salvesen G., Nagase H., (1990) Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (Stromelysin). *Biochemistry*, 29(44): 10261 - 10270

Tardif G., Pelletier J.-P., Dupuis M., Geng C., Cloutier J.-M., and Martel-Pelletier J. (1999). Collagenases 3 Production by Human osteoarthritic Chondrocytes in Response To Growth Factors and Cytokines is a Function of The Physiologic State of the Cells. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 42, No. 6, pp. 1147-1158.

Tardif G, Reboul P, Dupuis M, Geng C, Duval N, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. (2001). Transforming growth factor-beta induced collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes is triggered by Smad proteins: cooperation between activator protein-1 and PEA-3 binding sites. *J Rheumatol.* 28(7):1631-9.

Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. (1994). Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Apr 15;200(1):142-8.

Tetlow L. C., Adlam D. J., and Woolley D. E. (2001). Matrix Metalloproteinase and Proinflammatory Cytokine Production by Chondrocytes of Human Osteoarthritic Cartilage: Associations With Degenerative Changes. *Arth. & Rheum* 44 ( 3 ):585-594

Tiku M. L., Liesch J. B., Robertson F. M. (1990) Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes: enhancement by cytokines. *J. Immuno.* 145: 690 – 696.

Tiku ML, Yan YP, Chen KY. (1998) Hydroxyl radical formation in chondrocytes and cartilage as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy using spin trapping reagents. *Free Radic Res.* 29(3):177-87.

Tiku M. L., Shah R., Allison G. T. (2000) Evidence linking chondrocytes lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation: possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *JBC* 275(26): 20069- 20076.

Tiku ML, Allison GT, Naik K, Karry SK. (2003). Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 11(3):159-66.

Tomita M., Sato E. F., Nishikawa M., Yamano Y., Inoue M. (2001) Nitric oxide regulates Mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. *Arth. & Rheum.* 44(1): 96- 104

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992;24:145-9.

Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol. Chem* 274: 2234-2242.

Uchida K. Kumagai T. (2003) 4-hydroxy-2-nonenal as COX-2 inducer. *Molecular aspects of Med.* 24: 213 –218

Uchida K. (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 42(4):318-43.

Ullrich O, Huser H., Ehrlich W, Grune T. (1997) Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal on primary cultures of rabbit synovial fibroblasts. *Fre Rad. Biol. & Med.* 22(7): 1153 – 1157

Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, Lopez-Otin C, (1998). Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 273(16):9769-77.

Usatyuk PV, Natarajan V.(2004). Role of mitogen-activated protein kinases in 4-hydroxy-2-nonenal-induced actin remodeling and barrier function in endothelial cells. *J Biol Chem*; 279(12):11789-11797.

van Iersel ML, Ploemen JP, Lo Bello M, Federici G, van Bladeren PJ, (1997). Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact.* 108(1-2):67-78.

Vankemmelbeke MN, Jones GC, Fowles C, Ilic MZ, Handley CJ, Day AJ, Knight CG, Mort JS, Buttle DJ. (2003) Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters. *Eur J Biochem.* 2003 Jun;270(11):2394-403.

Van Wart H. E., and Birkedal-Hansen H.(1990). The Cysteine Switch: A Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity With Potential Applicability To The Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *Proc., Natl., Acad., Sci., USA* Vol. 87, pp. 5578-5582.

Vignon E, Garnero P, Delmas P, Avouac B, Bettica P, Boers M, Ehrich E, MacKillop N, Rovati L, Serni U, Spector T, Reginster JY; Respect of Ethics and Excellence in Science (GREES): Osteoarthritis Section. (2001). Recommendations for the registration of drugs used in the treatment of osteoarthritis: an update on biochemical markers. *Osteoarthritis Cartilage*;9(4):289-93.

Vincenti MP, Coon CI, Lee O, Brinckerhoff CE. (1994) Regulation of collagenase gene expression by IL-1 beta requires transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4818-27.

Vincenti M. P., Coon C. I., Mengshol J. A., Yocum Sue, Mitchell P., Brinckerhoff C. E (1998). Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). *Biochem J.* (1998) 331. 231-346

Vincenti M. P., Brinckerhoff C. E. (2001). Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$ . *Arthritis res.* 3: 381 –388

Vincenti M. P., Brinckerhoff C. E., Vincenti M. P. (2002). Transcriptional regulation of collagenases (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signalling pathways for the recruitment of gen-specific transcription factors. *Review. Arth. Res.* 4: 157 –164.

Violi F, Marino R, Milite MT, Loffredo L. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999 Jul-Aug;15(4):283-8.

Westermarck J, Kahari VM. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999 May;13(8):781-92.

Woessner J. F., (1991) Matrix metalloproteinase's and their inhibitors in connective tissue remodelling. *J. FASEB* 5(8): 2145 –2154

Woessner J. F. Jr, (1997). Regulation of matrilysin in the rat uterus. *Biochem Cell Biol.* 74(6):777-84. Review.

Yang Y., Sharma R., Sharma A., Awasthi S., and Awasthi Y. C. (2003). Lipid peroxidation and cell cycle signalling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signalling. Review. *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 50, No. 2/2003, 319-336

Yengi L, Inskip A, Gilford J, Alldersea J, Bailey L, Smith A, Lear JT, Heagerty AH, Bowers B, Hand P, Hayes JD, Jones PW, Strange RC, Fryer AA. (1996). Polymorphism at the glutathione S-transferase locus GSTM3: interactions with cytochrome P450 and glutathione S-transferase genotypes as risk factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 56(9):1974-7.

Zarkovic N. (2003) 4-Hydroxynonenal as a bioactive maker of pathophysiological processes. *Mol aspects of Med.* 24: 281- 291.

Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B. (1998). Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J Biol Chem.* 273(24):14989-97.



